

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO VEGETAL  
OBTENIDO DE UN CULTIVO COMERCIAL DE *Stevia rebaudiana* UBICADO EN  
OLAYA (ANTIOQUIA)**

**LAURA TATIANA MORALES ORJUELA**

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar por el título de  
Biólogo**

**Director**

**CARLOS ALBERTO PELÁEZ JARAMILLO**

**Ph.D. en Ciencias Químicas Instituto Químico de Sarria**

**Co-directores**

**JOHN JAIRO MÉNDEZ ARTEAGA**

**Ph. D. en Ciencias Químicas Universidad de Lleida**

**CAROL JOHANNA DÍAZ GUTIÉRREZ**

**cPh.D. en Biología Universidad de Antioquia**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROGRAMA DE BIOLOGIA**

**IBAGUE-TOLIMA**

**2017**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO**

**TÍTULO ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO  
VEGETAL OBTENIDO DE UN CULTIVO COMERCIAL DE *Stevia rebaudiana*  
UBICADO EN OLAYA (ANTIOQUIA)**

**AUTORES** Laura Tatiana Morales Orjuela (070150582012)  
**DIRECTOR** Carlos Alberto Peláez Jaramillo (Universidad de Antioquia)  
**CO-DIRECTOR(ES)** Jonh Jairo Méndez Arteaga (Universidad del Tolima)  
Carol Johanna Diaz Gutiérrez (Universidad de Antioquia)

**JURADOS** David Santiago Riveros Galán (Investigador Independiente)  
Maryeimy Varón López (Universidad del Tolima)

**CALIFICACIÓN** 4.5

☒ **APROBADO**

☐ **REPROBADO**

**OBSERVACIONES** \_\_\_\_\_

Tesis Meritoria

**FIRMAS**

Santiago R.

**JURADO 1.**

[Firma]  
**Director del trabajo**

[Firma]

**JURADO 2.**

[Firma]  
**Director del Programa (ad hoc)**

**Ciudad y fecha:** 26/06/18

## DEDICATORIA

A Dios y la Virgen María, por darme la sabiduría y el entendimiento de poder iluminar mi mente para alcanzar mis objetivos, haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi Ángel Custodio (QEPD), que desde el cielo me acompaña en cada uno de los pasos que doy a diario, sé que este logro es motivo de orgullo para él, ya que fue el mejor de los abuelos quien me enseñó con su cariño y ternura a ser la persona que soy.

A mis padres, Oscar Morales y Janneth Orjuela quienes me regalaron la vida y con todo el amor me enseñaron los principios fundamentales para salir adelante, gracias a ustedes pude culminar una etapa más en mi vida y son las personas a quien les debo mis triunfos.

A mi familia, como mi tía Pilar, a quien quiero como una madre y por estar dispuesta ayudarme en cualquier momento. A mis hermanos, a mis abuelas Aurora y Flor, y demás familia, quienes estuvieron acompañándome en todo mi proceso tanto académico como personal, son ustedes el motivo para seguir luchando.

A todos mis amigos, tanto de Ibagué y Medellín, que aportaron su granito de apoyo y amistad acompañándome en mi formación profesional.

***Muchas gracias a todos.***

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor expresa sus agradecimientos:

Al Dr. Carlos Alberto Peláez, director del trabajo de investigación por brindarme la oportunidad de culminar mis estudios con su apoyo y dedicación.

A la Dra. Carol Johanna Díaz, codirectora del trabajo por enseñarme, instruirme, apoyarme en este camino con paciencia, dedicación e incondicional amistad.

Al Dr. John Jairo Méndez director de la Oficina de Investigaciones y Desarrollo Científico de la Universidad del Tolima, codirector del trabajo por su respaldo y asesoría.

Al Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares GIEM de la Universidad de Antioquia, quienes me acogieron y me brindaron el apoyo académico y logístico para culminar mi trabajo de investigación.

Al Lic. David Rodas, por la colaboración en ensayos microbianos, especialmente por su dedicación, apoyo y amistad durante el desarrollo del trabajo.

Al profesor Jorge Andrés Hoyos, por la asistencia en ensayos de actividad antioxidante.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>1. OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
1.1. OBJETIVO GENERAL	11
1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	11
<b>2. MARCO REFERENCIAL</b>	<b>12</b>
2.1. ANTECEDENTES	12
2.2. MARCO TEORICO	14
2.2.1. <i>Stevia rebaudiana</i>	14
2.2.2. Actividad antioxidante	16
2.2.3. Actividad antimicrobiana	17
<b>3. METODOLOGÍA</b>	<b>19</b>
3.1. CULTIVO DE PLANTAS MADRE DE <i>S. rebaudiana</i>	19
3.1.1 Enraizamiento de esquejes a partir de plantas madre	21
3.2 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	22
3.2.1. Cultivo para producción de hoja	22
3.3. COLECTA DE MATERIAL VEGETAL	24
3.4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL	25
3.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	27
3.5.1. Método DPPH (Difenil Picril Hidrazilo)	27
3.5.2. Método ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina- 6-ácido sulfónico)	27
3.5.3. Determinación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu	28
3.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	28

3.6.1.	Actividad bacteriana de los extractos de <i>Stevia rebaudiana</i> sobre <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> por el método de difusión en disco	28
	Actividad Fúngica sobre <i>Fusarium oxysporum</i> por el método	
3.6.2.	modificado de pozos de agar	29
3.7	ANALISIS ESTADISTICO	31
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE HOJA, TALLO Y HOJA AGOTADA DE <i>Stevia rebaudiana</i>	33
4.1.1.	Cuantificación de la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS	34
4.1.2.	Cuantificación del contenido de compuestos fenólicos por el método Folin-Ciocalteu	36
4.2	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE HOJA, TALLO Y HOJA AGOTADA DE <i>Stevia rebaudiana</i>	38
4.2.1	Actividad Bactericida sobre <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	39
4.2.2	Actividad Fungicida sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	42
5.	CONCLUSIONES	46
	RECOMENDACIONES	47
	REFERENCIAS	48

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
<b>Figura 1.</b> Esquema general de la morfología de <i>Stevia rebaudiana</i>	15
<b>Figura 2.</b> Ubicación del cultivo de plantas madre de <i>Stevia rebaudiana</i> , en el corregimiento de Santa Helena (Antioquia).	19
<b>Figura 3.</b> Cultivo de plantas madre de <i>Stevia rebaudiana</i> ubicado en Santa Elena-Medellín, Antioquia	20
<b>Figura 4.</b> Cultivo de plantines de estevia bajo invernadero	21
<b>Figura 5.</b> Ubicación del cultivo para la producción de hoja de estevia, en el municipio de Olaya – Antioquia	22
<b>Figura 6.</b> Cultivo de hoja de <i>Stevia rebaudiana</i> ubicado en Olaya, Antioquia	23
<b>Figura 7.</b> Selección del material vegetal	24
<b>Figura 8.</b> Extractos de <i>Stevia rebaudiana</i>	26
<b>Figura 9.</b> (A). Hongo <i>Fusarium oxysporum</i> (B). Fungicidas utilizados como control positivo.	30
<b>Figura 10.</b> Actividad antioxidante de los extractos de <i>Stevia rebaudiana</i> , con los métodos ABTS y DPPH	34
<b>Figura 11.</b> Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos en extractos de hoja, tallo y hoja agotada de plantas de <i>Stevia rebaudiana</i> con el método Folin-Ciocalteu	36
<b>Figura 12.</b> Actividad bacteriostática con extractos de hoja, tallo y hoja agotada de plantas de <i>Stevia rebaudiana</i>	39
<b>Figura 13.</b> Antibiograma de control con el método de difusión en Disco, sobre <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	40
<b>Figura 14.</b> Actividad fungicida con el método de modificación de pozos de agar PDA, con extractos de <i>Stevia rebaudiana</i> .	42
<b>Figura 15.</b> Actividad fungicida en extractos de <i>Stevia rebaudiana</i> con el método de modificación de pozos de agar PDA.	43
<b>Figura 16.</b> Actividad fungicida de control mediante la modificación de pozos de agar PDA, sobre <i>Fusarium oxysporum</i> .	44

## RESUMEN

En este trabajo se evaluó la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos de hoja, tallo y hoja agotada de un cultivo comercial de *Stevia rebaudiana*, ubicado en el municipio de Olaya (Antioquia), a través de los métodos ABTS, DPPH, Folin-Ciocalteu y discos Kirby-Bauer frente a *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) y *Escherichia coli* (Gram negativa); también la modificación de pozos en agar PDA con *Fusarium oxysporum*.

Los resultados para los métodos ABTS, DPPH y fenoles totales indicaron mayor actividad antioxidante ( $p < 0.05$ ) para el extracto obtenido a partir de la hoja, con valores de 648  $\mu\text{M}$  Trolox equiv/g peso<sup>-1</sup>, 541  $\mu\text{M}$  Trolox equiv/g peso<sup>-1</sup>, y 10,2 mg ácido gálico equiv/g masa seca<sup>-1</sup>, respectivamente.

Adicionalmente, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos sobre *S. aureus* y *E. coli*, evidenciando un halo de inhibición, como rastro de actividad bacteriostática, en los tres extractos evaluados (hoja, tallo y hoja agotada). Asimismo, se cuantificó el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *F. oxysporum* frente a los extractos, obteniendo como resultado un 50% de actividad fungicida para el extracto de hoja, 28% en tallo y 12% en hoja agotada, siendo el extracto a partir de hoja el que presentó mayor actividad fungicida ( $p < 0.05$ ).

Por último, este trabajo permite conocer el potencial antioxidante y antimicrobiano que posee el extracto de *Stevia rebaudiana*, con el fin de aprovechar los residuos (tallo y hoja agotada) que se generan luego del proceso de selección de material vegetal y extracción, generando nuevas herramientas e información acerca de las propiedades y beneficios que se pueden obtener de esta planta.

**Palabras Claves:** *Stevia rebaudiana*, Extracción, Actividad antioxidante, Actividad antimicrobiana.



## ABSTRACT

This work evaluated the antioxidant and antimicrobial activity of leaf extracts, stem and leaf depleted of a commercial crop of *Stevia Rebaudiana*, located in the municipality of Olaya (Antioquia), through the methods ABTS, DPPH, Folin-Ciocalteu and discs Kirby-Bauer versus *Staphylococcus aureus* (Gram positive) and *Escherichia coli* (Gram negative); also the modification of wells in PDA agar with *Fusarium oxysporum*.

The results for the methods ABTS, DPPH and Phenols total indicated greater antioxidant activity ( $P < 0.05$ ) for the extract obtained from the leaf, with values of 648  $\mu\text{m}$  Trolox equiv/g weight-1, 541  $\mu\text{m}$  Trolox equiv/g weight-1, and 10.2 mg Gallic acid equiv/g dry mass-1 Respectively.

Additionally, the antimicrobial activity of the extracts on *S. aureus* and *E. coli* was evaluated, showing a halo of inhibition, as a trace of bacteriostatic activity, in the three extracts evaluated (leaf, stem and leaf exhausted). Likewise, the percentage of inhibition of the growth of the fungus *F. Oxysporum* against the extracts was quantified, obtaining as a result a 50% fungicide activity for the leaf extract, 28% in stem and 12% in depleted leaf, being the extract from leaf which It showed greater fungal activity ( $p < 0.05$ ).

Finally, this work allows to know the potential antioxidant and antimicrobial that possesses the extract of *Stevia rebaudiana*, in order to take advantage of the residues (stem and leaf exhausted) that are generated after the process of selection of vegetal material and extraction, generating new tools and information about the properties and benefits that can be obtained from this plant.

**Keywords:** *Stevia rebaudiana*, extraction, antioxidant activity, antimicrobial activity.

## INTRODUCCIÓN

El aumento del consumo de azúcar ha generado un problema nutricional, alterando el síndrome metabólico en niños y adultos de todo el mundo (Lustig, D. et al. 2001). También existen las diversas reacciones bioquímicas en el ser humano, que generan especies reactivas de oxígeno, las cuales son capaces de dañar biomoléculas cruciales. Si estas especies no son captadas eficientemente por constituyentes celulares, pueden ocasionar enfermedades y en algunos casos llevar a la muerte (Halliwell, B. 1991). Estas reacciones producen especies químicas que son conocidas como, radicales libres, que pueden ser bloqueadas por sustancias antioxidantes, las cuales captan los radicales libres detoxificando el organismo (Halliwell, B. 1997).

Investigaciones recientes sobre los radicales libres han confirmado que los alimentos ricos en antioxidantes juegan un papel esencial en la prevención de afecciones neurodegenerativas, cardiovasculares y cancerígenas (Gerber, M. et al. 2002; Etherton, P. et al. 2002), enfermedades como el Parkinson y Alzheimer (Vincenzo, D. & Ennio, E. 2003), así como también la inflamación y problemas ocasionados por el envejecimiento celular (Ames, S. et al. 1993). A partir de esto, ha aumentado la atención en la búsqueda de nuevos antioxidantes naturales para el control de enfermedades, que impliquen el daño oxidativo (Dorman, H. & Hiltunen, R. 2004).

Del otro lado, la importancia de los productos naturales se basa, no solamente en sus efectos farmacológicos o terapéuticos sino en la posibilidad para desarrollar, a partir de sus estructuras, nuevos fármacos los cuales deben ser menos tóxicos para el cuerpo humano (Phillipson, J. 1994); buscando tratar numerosas enfermedades con productos naturales o derivados de los mismos, que a su vez tengan la capacidad de prevenir o contrarrestar aquellas patologías de origen infeccioso (Reis, I. et al. 2012).

Más del 80% de los productos con potencial antimicrobiano empleados hoy en día provienen de fuentes naturales. Debido a las necesidades que pueden presentar las plantas al estar expuestas a un ambiente, caracterizado por una diversidad microbiana patógena, estas se ven obligadas a generar un mecanismo de protección, y así garantizar su adaptación al medio. En consecuencia, las especies vegetales son capaces de producir y bioprocasar un sinnúmero de metabolitos y elementos inorgánicos, que han sido extraídos y empleados empíricamente durante siglos por la población mundial en el tratamiento de estas patologías (Shahidi, F. & Ambigaipalan, P. 2015).

Varios estudios demuestran que los extractos de *Stevia rebaudiana*, han sido sometidos a rigurosas investigaciones bioquímicas, farmacológicas, clínicas y toxicológicas, surgiendo nuevas aplicaciones terapéuticas, haciendo que el uso de los fármacos tradicionales se racionalice, debido a los enfoques científicos modernos. Además, con la finalidad de encontrar nuevas alternativas para el control de microorganismos patógenos, se ha impulsado el estudio de metabolitos de plantas que propicien nuevos principios activos, y a su vez que inhiban el crecimiento bacteriano y fúngico (Taroco, et al. 2006; Sánchez, G. et al. 2016; Hui, Y. et al. 2017).

Es importante resaltar que durante el proceso de extracción de metabolitos, algunos consideran “desechos vegetales” las partes de la planta que no se vuelven a utilizar durante este proceso. Estas partes pueden ser una inmensa fuente de inapreciables y valiosos compuestos químicos (Landázuri, P. & Tigrero, J. 2009). Esto se debe a que los desechos de origen vegetal a menudo contienen antioxidantes y beneficios antimicrobianos naturales, que son mucho más seguros que los productos sintéticos y constituyen una gran fuente de compuestos valiosos (Puri, M. et al. 2012).

Finalmente, el presente trabajo pretende aportar y complementar la información existente sobre los beneficios que se pueden obtener de los extractos de hoja, tallo y hoja agotada de *Stevia rebaudiana* variedad Morita II en Colombia, mediante los análisis de su actividad antioxidante y antimicrobiana.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos de hoja, tallo y hoja agotada de un cultivo comercial de *Stevia rebaudiana*, ubicado en el municipio de Olaya (Antioquia).

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar la actividad antioxidante de los extractos de hoja, tallo y hoja agotada de *Stevia rebaudiana* mediante los métodos DPPH y ABTS.
- ✓ Establecer el contenido de fenoles totales de los extractos de hoja, tallo y hoja agotada de *Stevia rebaudiana*, por el método de Folin Ciocalteu.
- ✓ Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de hoja, tallo y hoja agotada de *Stevia rebaudiana* sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Fusarium oxysporum*.

## **2. MARCO REFERENCIAL**

### **2.1 ANTECEDENTES**

En la actualidad varios científicos confirman los beneficios que tienen los extractos naturales, considerándolos como una de las más importantes modalidades de la medicina complementaria. Numerosas enfermedades son tratadas con productos fitofarmacéuticos o derivados de los mismos, fundamentalmente aquellas de origen infeccioso y las resultantes de los radicales libres del organismo. Más del 80% de los productos con actividad antimicrobiana empleados hoy en día provienen de fuentes naturales, mientras que casi en su totalidad de las especies antioxidantes tiene un origen vegetal. En consecuencia, las especies vegetales son capaces de producir y bioprocesar un sinnúmero de metabolitos y elementos inorgánicos, que han sido extraídos y empleados empíricamente durante siglos por la población mundial en el tratamiento de diferentes patologías (Escalona, J. 2011).

Muchos antioxidantes naturales, muestran un amplio rango de efectos biológicos incluyendo funciones antibacteriales, antivirales, antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas y vasodilatadores (Daymy, A. et al. 1999). La suplementación con antioxidantes está fundamentada en estudios epidemiológicos y clínicos que demuestran la estrecha relación entre factores como: dieta, estilo de vida, exposición a radiación, metales, pesticidas, tóxicos, y algunos medicamentos; con la aparición y desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis, desórdenes neurodegenerativos y envejecimiento (Soto, H. 2007). Todas estas condiciones patológicas están asociadas a un estado conocido como “estrés oxidativo”, es decir, un aumento en las especies oxidantes (principalmente Especies Reactivas del Oxígeno–EROs) y/o una disminución en los mecanismos de detoxificación de ellas (Gerber, M. et al. 2002; Etherton, P. et al. 2002).

Estudios como el de Tomita, et al. en 1997, comprueban la actividad biológica del compuesto de *Stevia rebaudiana*, inhibiendo el crecimiento de ciertas bacterias y otros organismos infecciosos, ayudando a explicar su uso tradicional en el tratamiento de heridas, llagas y enfermedades de las encías. Otros autores han estudiado la actividad bactericida del extracto de *S. rebaudiana* hacia *Escherichia coli* enterohemorrágica y otras bacterias patógenas transmitidas por los alimentos. También se ha encontrado que otros microorganismos como *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* son inhibidos por el extracto de las hojas de *Stevia rebaudiana* (Mousumi, D. 2008).

Maricruz, O. et al. (2015) confirman que las bacterias en el aire son componentes biológicos que pueden ocasionar efectos adversos a la salud humana. Las bacterias que se encuentran con mayor frecuencia aisladas del aire son las *Pseudomonas sp* y *Staphylococcus sp*. Los reportes demuestran que estas bacterias tienen la habilidad genética para transferir y adquirir factores de resistencia a diferentes sustancias. Esto ha impulsado el estudio de productos obtenidos de plantas que proporcionen nuevos principios activos, con la finalidad de encontrar nuevas alternativas, para el control de microorganismos patógenos que inhiban el crecimiento bacteriano.

Monaim, et al. (2011), afirman que, desde hace años, el control de las enfermedades fúngicas en sistemas agrícolas ha dependido, en gran medida, de los tratamientos con agroquímicos. Sin embargo, su uso representa un severo riesgo para la salud humana y contribuye al aumento de la contaminación al medioambiente.

En el caso de *Fusarium oxysporum*, es un patógeno de importancia económica, que infecta a más de 100 especies de plantas, afectando principalmente sus raíces. Este hongo tiene la capacidad de atravesar la barrera de los reinos, y se evidencia en el estudio de Ortoneda M. et al. 2004, donde se estableció que un solo aislado de *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, causó enfermedad tanto en plantas de tomate como en ratones inmunodeprimidos (Gómez, A. Corredor, M. & Peláez, C. 2015).

## 2.2 MARCO TEORICO

Los extractos de *Stevia rebaudiana* son conocidos por sus propiedades edulcorantes naturales sin calorías, teniendo una fuente de metabolitos importantes, como el glucósido de diterpeno (glucósido de esteviol), siendo este, una alternativa para disminuir el consumo de sacarosa. También se ha demostrado en varios estudios las propiedades terapéuticas que esta posee, como actividad antioxidante y antimicrobiana, indicando que estevia es apto para el consumo humano (O'Keefe, J. & Bell, D. 2007; Malik, V. et al. 2006; Mattes, R. & Popkin, B. 2009).

**2.2.1 *Stevia rebaudiana*:** Es una planta herbácea perenne de la familia Asteráceae. Fue descrita botánicamente en 1905, por el naturista Moisés Santiago Bertoni. La mayoría de los botánicos admiten que la estevia es una planta auténticamente paraguaya, originaria de la región oriental del país, donde era utilizada por los indígenas como edulcorante y para fines medicinales (Figura 1) (Brandle, J. & Telmer, P. 2007; Tadhani, M. Patel, V. & Rema, S. 2007).

En 1997 Ngowata, purificó el extracto de estevia obteniendo un compuesto llamado esteviósido, un polvo blanco y altamente natural. Los investigadores informaron que los extractos de *Stevia rebaudiana* se utilizan como edulcorante natural o en suplementos dietéticos por su contenido de glucósidos: esteviósido y rebaudiósido con características químicas y farmacológicas adecuadas para su uso en la alimentación humana (Durán, A. et al. 2012).

Varios autores han indicado que estevia presenta poder edulcorante, cuyos dos glucósidos principales son el esteviósido (110-270 veces más dulce que el azúcar) y rebaudiósido (180-400 veces más dulce que el azúcar), este último de mayor valor comercial (Cruz M. 2015), el cual los científicos lo llaman una “molécula noble”, debido a que es 100% natural, no tiene calorías. Otras ventajas que presenta es que no elevan los niveles de glucosa en la sangre, no aporta calorías al ser metabolizado, es antiácido, cardiotónico, no produce caries al no ser fermentado por las bacterias orales, y se

distingue de los edulcorantes artificiales por no tener sabor metálico y no ser cancerígeno (RIRDC. 2002).

Durante los últimos años se han realizado investigaciones que se enfocan en extraer los metabolitos secundarios de estevia con diferentes sistemas de disolventes orgánicos, de acuerdo con la naturaleza de los compuestos (Edelsztein, V. 2011). Los extractos polares han sido ampliamente utilizados en investigaciones a nivel mundial por su gran capacidad de extracción, siendo el metanol un agente de extracción de menor costo y que puede retirarse con procesos sencillos para garantizar concentraciones no tóxicas para el organismo (Hernández, D. & Rodríguez, J. 2001). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ha reconocido la seguridad del extracto foliar para uso alimentario desde 2011. Además, las hojas secas también contienen altos niveles de fenoles totales con una alta capacidad antioxidante con sus efectos potencialmente beneficiosos para la salud humana (Lemus, R. et al., 2012).

**Figura 1.** Esquema general de la morfología de *Stevia rebaudiana*.



Fuente de: <http://www.aldeademascotas.com/wp-content/uploads/2015/11/stevia-s.jpg> (2017)



**2.2.2 Actividad antioxidante:** Es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, de tal manera que un antioxidante actúe, principalmente para reaccionar con radicales libres (Londoño, J. 2012). Estos son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre, por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células, provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos (Avello, M. & Suwalsky, M., 2006). Por lo tanto, estas sustancias reciben el nombre de antioxidante terminador de cadena (Londoño, J. 2012).

La evaluación de los antioxidantes se inicia en los años 60 cuando algunos estudios revelaron la importancia de estos en la salud, con publicaciones acerca del efecto de los flavonoides, el ácido ascórbico y el estrés oxidativo en el cáncer (Cameron, E. & Pauling, 1978). La expansión en la investigación de los antioxidantes se veía en las décadas subsiguientes, en donde varios investigadores se dedicaron a estudiar el efecto protector de los antioxidantes en diferentes patologías, intentando entender sus mecanismos y blancos moleculares (Willett, W. & Mac Mahon. 1984). Para los años 90 el uso de los antioxidantes se había popularizado en los Estados Unidos, de tal manera que la mitad de la población consumía suplementos dietarios, un tercio tomaba multivitamínicos y alrededor de una octava parte de la población consumía periódicamente suplementos de vitaminas E y C (Radimer, K. et al. 2004).

La suplementación con antioxidantes está fundamentada en estudios epidemiológicos y clínicos que demuestran la estrecha relación entre factores como: dieta, estilo de vida, exposición a radiación, metales, pesticidas, tóxicos, y algunos medicamentos; con la aparición y desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis, desórdenes neurodegenerativos y envejecimiento (Valko, M. et al. 2007).

**2.2.3 Actividad antimicrobiana:** El uso de productos naturales con propiedades terapéuticas se viene usando durante varios años. Algunos estudios se enfocan en descubrir nuevos compuestos antimicrobianos de diversos tipos de fuentes tales como microorganismos, animales y plantas. Estos compuestos antibióticos se definen como aquella sustancia producida natural o sintéticamente, para inhibir el crecimiento de microorganismos (Tomoko, N. et al. 2002). Sin embargo, al considerar el caso de los países en desarrollo, se tiene que, las drogas sintéticas no sólo son costosas y en algunos casos inadecuadas para el tratamiento de enfermedades, sino que con frecuencia son adulteradas y presentan efectos secundarios (Shariff, Z. 2001).

La aparición de bacterias resistentes a múltiples fármacos es un grave problema de salud en todo el mundo, promoviendo la búsqueda de estrategias para combatir estos patógenos. Entre estas estrategias, se destacan el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos y el descubrimiento de agentes optimizadores relacionados con los existentes (Chaves, T. et al. 2018). Las enfermedades transmitidas por los alimentos ha aumentado significativamente en todo el mundo, debido al consumo de alimentos o agua contaminados con agentes químicos o biológicos, principalmente virus y/o bacterias (Hald, T. et al. 2016).

Los brotes por *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* han sido asociados en su gran mayoría al manejo deficiente de los alimentos por las personas que realizan la preparación de los productos frescos (Díaz, S. & Vernon, C. 1999; Raouf, U. et al. 1993). Teniendo en cuenta, la temperatura de almacenamiento constituye el factor principal para el desarrollo de bacterias, estas poseen dosis infecciosas bajas, y son fácilmente proliferadas porque pueden desarrollarse rápidamente en los alimentos, cuando encuentran condiciones apropiadas para su desarrollo (Parrilla, C. et al. 1993).

*E. coli* y *S. aureus* pueden causar implicaciones clínicamente severas. La intoxicación por *S. aureus* se debe a la ingestión de exotoxinas, que provocan náuseas, vómito, dolores abdominales y diarrea (Salyers, A. & Dixie, D. 1994). *E. coli* causa severos

desórdenes gastrointestinales, y en ambos casos, se ha reportado la muerte por infecciones de estos organismos patógenos (Monaim, M. et al., 2011).

También, se tienen diferentes reportes de la aparición de microorganismos altamente resistentes, que conducen a enfermedades fúngicas con mayor incidencia que antes (Naeini, A. et al. 2010). Por ejemplo *F. oxysporum*, es un patógeno trans-reino ampliamente conocido en el mundo, y se ha convertido en un problema serio ya que producen metabolitos tóxicos. Además, incluye muchos patógenos, para las plantas de importancia agrícola, que en conjunto ocasionan enfermedades características de la marchitez, tizones, pudriciones en cultivos ornamentales y forestales en ecosistemas agrícolas y naturales (Ma, L. et al. 2013). Para reducir este problema, existe la necesidad de buscar y adoptar estrategias que sean accesibles, sencillas de aplicar y no tóxicas para seres humanos y animales (Naeini, A. et al. 2010).

Asimismo es un patógeno emergente de humanos inmunocomprometidos y otros mamíferos, *F. oxysporum* complejo y *F. solani* complejo son las especies más frecuentemente aisladas a partir de muestras de laboratorio clínico, llegando a constituir en algunos centros, la segunda causa más frecuente de infección por hongos filamentosos después de *Aspergillus sp.* Rabodonirina et al., en 1994, plantearon que especies de *Fusarium* consideradas previamente habitantes del suelo y contaminantes del laboratorio, han emergido con significancia en pacientes inmunosuprimidos, en los cuales se presenta una alta mortalidad (Gómez, A. et al. 2015).

A demás las plantas pueden poseer productos naturales antimicrobianos para protegerse de las infecciones y el deterioro (Cowan, M. 1999). Como lo es *S. rebaudiana* ya que es una planta utilizada en la medicina tradicional por sus múltiples propiedades, por ejemplo, algunos estudios demuestran el efecto antibacteriano del extracto etanólico de hojas frescas de *S. rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans*, con seis concentraciones en etanol de 70% y seis concentraciones en etanol de 30%, este concluyó que el extracto etanólico de *S. rebaudiana* posee efecto antibacteriano sobre *S. mutans* (Pérez, G. 2013).

Otro trabajo concluye que el extracto hidroalcoholico de *Stevia rebaudiana* tiene un efecto antibacteriano *in vitro* sobre *Actinomyces viscosus* (Reyes, K. et al. 2018). Es por esto que ha aumentado el interés por el uso de compuestos naturales, especialmente extraídos de las plantas, para la conservación de los alimentos. Además, hay más consumidores que tienden a cuestionar la seguridad de los aditivos sintéticos y preferirían los alimentos naturales (Nychas, G. 1995; Smid, E. & Gorris, L. 1999).

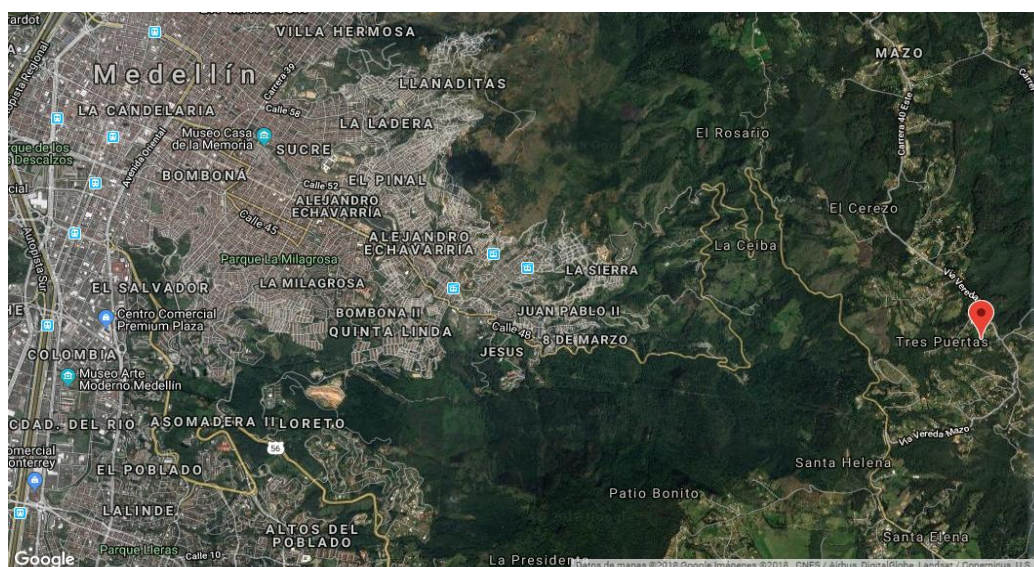
### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 CULTIVO DE PLANTAS MADRE DE *S. rebaudiana*

El cultivo de *Stevia rebaudiana*, se puede propagar de diferentes formas, con el fin de conservar sus características genéticas más importantes, como la producción de biomasa y contenido de esteviósidos. Para lograr lo anterior, se realiza la propagación a partir de esquejes, cortes de ramas o tallos secundarios y terciarios, este método es más fácil, rápido y económico en comparación con los otros tipos de propagación (Tamayo, V. 2006).

El cultivo de plantas madres se encuentra ubicado en el corregimiento de Santa Elena (Municipio de Medellín, Antioquia) en la vereda El Placer ( $6^{\circ}13'42.93''\text{N}$  y  $75^{\circ}29'36.64''\text{O}$ ), a una altura de 2569 m.s.n.m., con 53% de humedad relativa y  $14,5^{\circ}\text{C}$  de temperatura promedio. Se localiza a 17 kilómetros del centro de la ciudad de Medellín, donde limita con los municipios de Copacabana, Bello, Rionegro, Guarne y Envigado (Figura 2).

**Figura 2.** Ubicación del cultivo de plantas madre de *Stevia rebaudiana*, en el corregimiento de Santa Helena (Antioquia).



Fuente. Google Earth©

Esta zona de cultivo se dedica al cuidado de plantas madres, bajo condiciones de invernadero, las cuales son usadas como fuente primaria para las propagaciones *in vivo* e *in vitro*. Su función principal, es servir como repositorio de material y fuente de material de propagación para el establecimiento de nuevas plantaciones. Para que el material de propagación se preserve libre de organismos patógenos, requiere atención en algunos aspectos como son las medidas de control fitosanitario de plagas y enfermedades, evitando afectaciones sobre la cadena productiva. El empleo de medidas de sanidad es esencial para eliminar los agentes causantes de enfermedades que pueden estar en el equipo, herramienta, mezcla de suelo o similares (Tamayo, 2006).

El cultivo de plantas madre (Figura 3) tiene un control de poda para poder obtener los esquejes. Se seleccionan las ramas juveniles de las plantas madres adultas las cuales deben reunir las siguientes características: plantas vigorosas y sanas, tener un mínimo de 5 pares de hojas abiertas y opuestas, el esqueje no debe presentar flor o botón floral (las hojas alternas son un síntoma de próxima floración) y debe tener entre 10 y 12 cm de longitud y como mínimo 5 pares de hojas. Se recomienda que los esquejes sean sembrados lo más rápido posible, teniendo cuidado en la manipulación para su preparación de siembra.

**Figura 3.** Cultivo de plantas madre de *Stevia rebaudiana* ubicado en Santa Elena-Medellín, Antioquia.



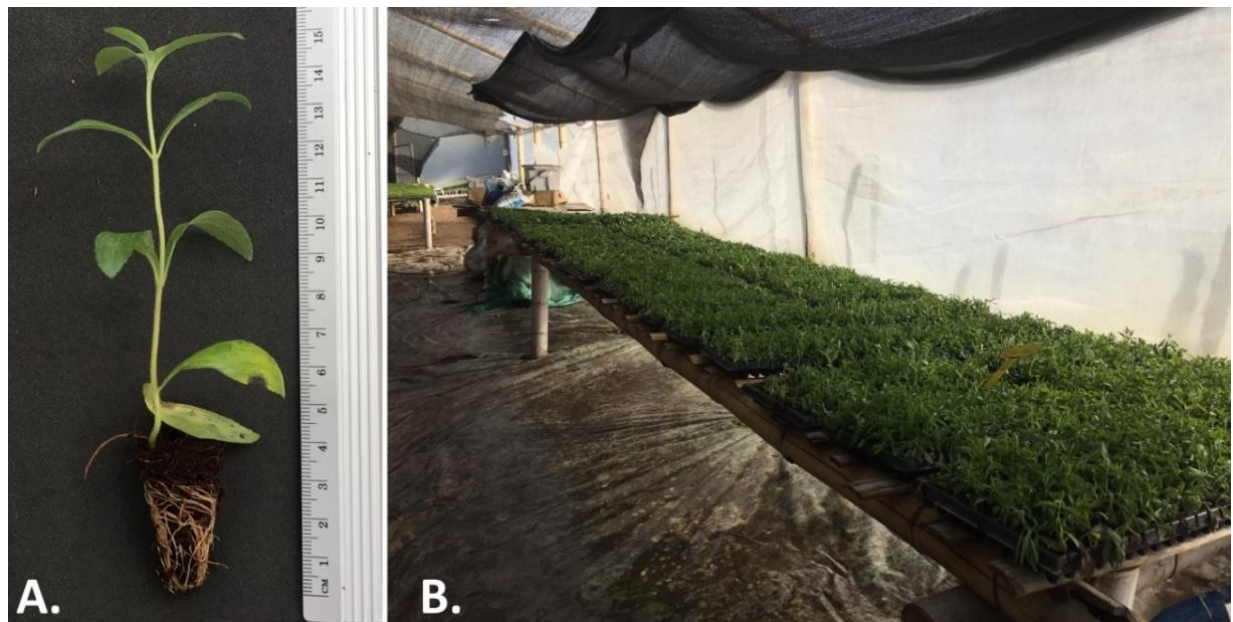
Fuente: El autor



**3.1.1** Enraizamiento de esquejes a partir de plantas madre. Los esquejes obtenidos del cultivo de plantas madre, con un aproximado de 10 a 15 esquejes adquiridos por cada una de las plantas madre, son cultivados en bandejas de siembra en camas elevadas de enraizamiento, en óptimas condiciones de luz y riego (Figura 4). El enraizamiento se realiza bajo invernadero, empleando una mezcla de sustratos a base de turba y sustracoco, utilizando hormona IBA.

Los plantines tardan en enraizar aproximadamente 20 días, pero pueden permanecer hasta un mes en el vivero siempre y cuando se les realice una poda de formación. Los sustratos empleados deben ser desinfectados para evitar problemas fitosanitarios y así, llevar al sitio de siembra definitiva, plantines sanos y vigorosos, que aseguren el éxito del cultivo y disminuyan el riesgo de transportar plagas y enfermedades de un lugar a otro.

**Figura 4.** Cultivo de plantines de estevia bajo invernadero. (A) Plantín de *Stevia rebaudiana* 20 días después de la siembra. (B) Bandejas de siembra en camas elevadas de enraizamiento.

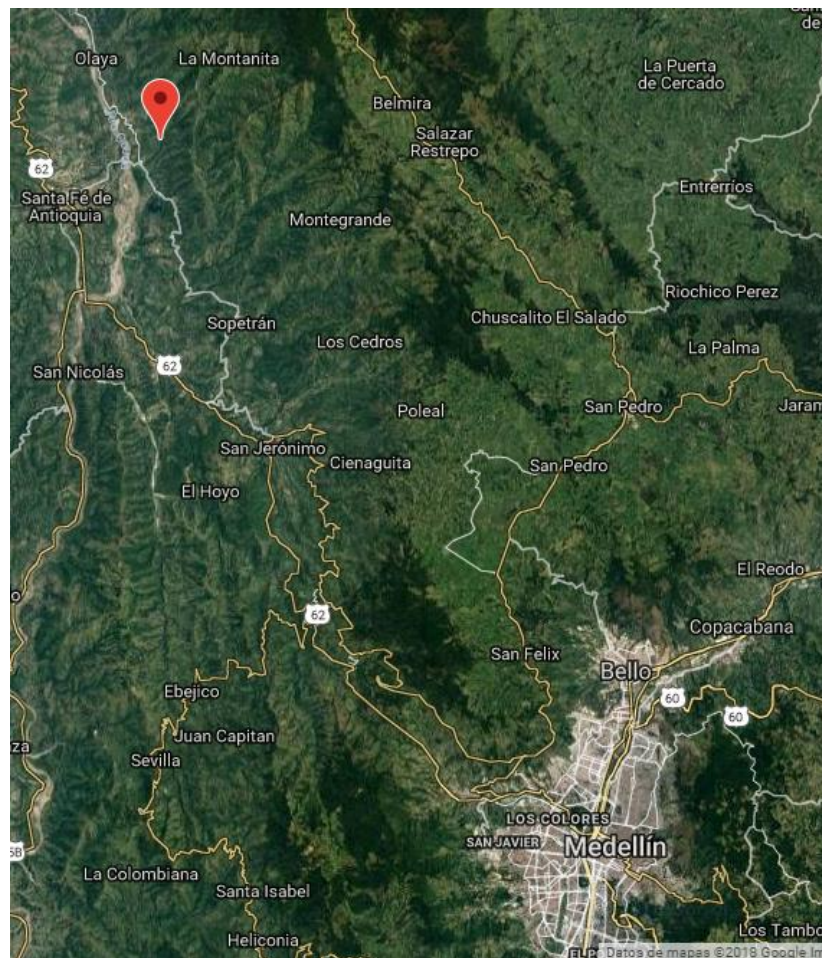


Fuente: Autor

### 3.2 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

**3.2.1 Cultivo para producción de hoja:** El cultivo para la producción de hoja de estevia se encuentra ubicado en Olaya, Antioquia, en la finca La Venturosa ( $6^{\circ}35'18''$  N y  $75^{\circ}46'55''$  O), a una altura de 590 m.s.n.m., 38% de humedad relativa y  $33^{\circ}\text{C}$  de temperatura promedio. Su cabecera municipal está a 100 km de Medellín, donde limita con los municipios de Belmira, Sopetrán y Santa Fe de Antioquia (Figura 5). En esta zona el cultivo se dedica a la producción de hoja de estevia, como etapa final del ciclo productivo agronómico de la planta.

**Figura 5.** Ubicación del cultivo para la producción de hoja de estevia, en el municipio de Olaya (Antioquia).



Fuente. Google Earth©

Los plantines que llegan al cultivo, provenientes del cultivo de Santa Elena, se siembran a una profundidad de 15 cm aproximadamente, dejando enterrados los dos primeros



pares de hojas, con el fin de garantizar los rebrotes desde la superficie del suelo bajo un sistema de riego controlado (Figura 6). En Colombia se tiene un registro de siembra para cualquier época del año. La poda de las plantas es importante para este cultivo, ya que es una práctica que consiste en hacer cortes de esquejes y ramas, para estimular la brotación de yemas que van a dar origen a nuevas ramas, dándole más arquitectura y volumen a la planta, estimulando la ramificación y los rebrotes, aumentando su vida útil y vigor, potencializando su capacidad productiva (Tamayo, 2006).

**Figura 6.** Cultivo de hoja de *Stevia rebaudiana* ubicado en Olaya, Antioquia.



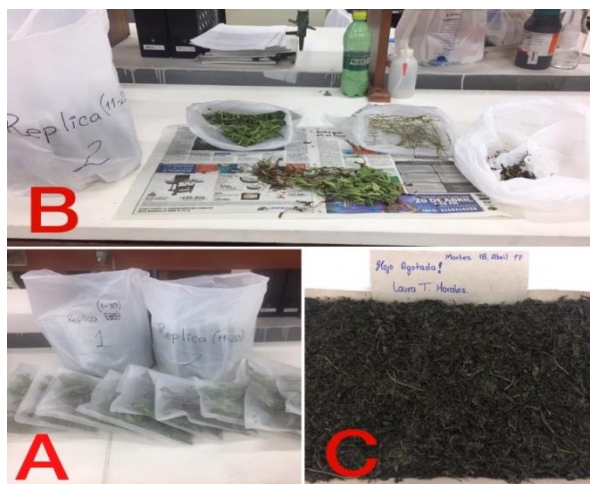
Fuente: El autor

### 3.3 COLECTA DE MATERIAL VEGETAL

Para obtener el material vegetal, se realizó un muestreo de 30 plantas mediante patrón de zigzag en una cama del cultivo, las plantas fueron podadas a una altura aproximada de 15 cm del suelo. Posteriormente el material colectado fue secado a temperatura ambiente de  $23 \pm 2$  °C, estas fueron extendidas sobre papel periódico y de manera manual se realizó rotación constante del material, evitando condiciones de humedad que pudieran afectar el proceso, con el fin de garantizar el color verde característico de la hoja.

Seguido a esto, se determinó la biomasa de cada planta, separando y discriminando el peso por hoja y tallo. Las muestras fueron clasificadas en 3 grupos (réplicas), cada uno con 10 ejemplares (Figura 7). Adicionalmente, se evaluó el subproducto que se obtiene luego del proceso de extracción de las hojas de estevia, denominada hoja agotada, el cual se realiza en el Grupo Interdisciplinario de Estudios Molecular (GIEM), con el fin de obtener el edulcorante de mesa. Utilizando la metodología ya estandarizada se obtuvieron 349 g de hoja agotada, este producto se secó a una temperatura de 55°C durante 48 horas y finalmente se determinó la biomasa como peso seco.

**Figura 7.** Selección del material vegetal. (A) Clasificación de las réplicas, (B) Separación del material en hoja y tallo, (C) Hoja agotada.



Fuente: El autor

### 3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL

El material vegetal previamente separado en hoja, tallo y hoja agotada se trituro utilizando una licuadora manual marca IMUSA de 350 W y se pasó por un tamiz malla N°30, garantizando de esta manera el mismo tamaño de partícula.

Para la extracción del material vegetal, se pesaron 0.5 gramos de muestra de hoja, tallo y hoja agotada, cada uno por triplicado. Se dispusieron en tubos de ensayo y en cada caso, se adicionaron 8 mL de solución metanol:agua (50:50 v/v) con un pH 2.0 ajustado

con ácido acético. Cada mezcla se agito mediante Vortex durante 1 min, se sónico en ultrasonido (Singen/Htw, Elma) a temperatura ambiente por 3 min (Gasmalla, et al. 2014) y por último se centrifugó a 6000 RPM durante 10 min. Este procedimiento se realizó por triplicado a cada una de las muestras, colectando el sobrenadante en un balón de 50 mL.

Posteriormente, se le adicionó al residuo vegetal, 8 mL de acetona:agua (70:30), pasando nuevamente por Vortex durante 1 min, luego en ultrasonido durante 3min y por último en centrifuga a 6000 revoluciones por minuto (r.p.m) durante 10 min. Los extractos fueron filtrados con una membrana de Nitrato de Celulosa (0.20  $\mu$ m) (Figura 8) y se recogió el sobrenadante en un balón de 50 mL. Este procedimiento se ejecutó por triplicado en cada una de las muestras y se aforó con agua Mili-Q. Finalmente, se pasaron por un filtro de jeringa de 0.2  $\mu$ m, obteniendo un extracto puro. Los extractos fueron almacenados a - 14°C.

**Figura 8.** Extractos de *Stevia rebaudiana*. (A) Filtración de los extractos, (B) Preparación de los extractos.



Fuente: El autor

### 3.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La determinación de la actividad antioxidante de los extractos de estevia, se evaluó mediante los métodos DPPH, ABTS y Fenoles totales.

**3.5.1 Método DPPH (Difenil Picril Hidrazilo):** Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de extracto vegetal de cada una de las muestras (hoja, tallo y hoja agotada), se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de metanol y 200  $\mu\text{L}$  de solución DPPH estándar Trolox. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Posteriormente, esta mezcla fue leída mediante un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 515 nm, para evaluar la absorbancia del radical con cada uno de los extractos vegetales (Blois, M. 1958).

Los resultados fueron expresados en micromoles de equivalentes Trolox (Tx) por gramos de muestra seca ( **$\mu\text{mol de Tx / g de MS}$** ). Este procedimiento se realizó cinco veces por cada una de las muestras de los extractos. Adicionalmente, se prepararon soluciones de Trolox a diferentes concentraciones entre 0 y 500  $\mu\text{M}$  con el fin de obtener la curva de calibración para el espectrofotómetro.

**3.5.2 Método ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina- 6-ácido sulfónico):** Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de cada uno de los extractos de hoja, tallo y hoja agotada, diluyéndolo con 1000  $\mu\text{L}$  de la solución ABTS estándar Trolox, luego se incubaron a una temperatura de 30°C por 30 min en condiciones de oscuridad. Posteriormente, esta mezcla fue leída con un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 730 nm, para así evaluar la absorbancia del radical con cada uno de los extractos (Re R. et al., 1999).

Los resultados fueron expresados en micromoles de equivalentes Trolox (Tx) por gramos de muestra seca ( **$\mu\text{mol de Tx / g de MS}$** ). Este procedimiento se realizó cinco veces por cada una de las muestras de los extractos. Adicionalmente, se prepararon soluciones de Trolox a diferentes concentraciones entre 0 y 500  $\mu\text{M}$  con el fin de obtener la curva de calibración para el espectrofotómetro.

**3.3.3** Determinación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu. Para determinar los fenoles totales se utilizó la metodología del ensayo Folin-Ciocalteu el cual consiste en tomar 20 µL de cada muestra de los extractos vegetales (hoja, tallo y hoja agotada) y mezclar con 1600 µL de agua destilada, 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu y 300 µL de solución de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 20%. Las mezclas se agitaron con Vortex durante 1 min y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad (Singleton V. et al., 1999.).

Posteriormente, esta mezcla fue leída mediante un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 725 nm, para evaluar la absorbancia del radical con cada uno de los extractos vegetales.

Estos resultados son expresados en mg de equivalentes de ácido gálico (AG) por gramos de muestra seca (**mg de AG / g de MS**). Este procedimiento se realizó cinco veces por cada una de las muestras de los extractos, para un total de 53 lecturas, contando con la recta patrón con soluciones acuosas de ácido gálico (entre 0 y 500 ppm) para la calibración del espectrofotómetro.

### **3.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

**3.6.1** Actividad Bacteriana de los extractos de *Stevia rebaudiana* sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en disco. Para determinar la actividad bacteriana se seleccionaron dos cepas de bacterias, que desempeñan un papel muy importante en brotes de enfermedades causadas por el consumo de alimentos, la cepa ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) y ATCC 25922 *Escherichia coli* (Gram negativa) del cepario del Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM) de la Universidad de Antioquia.

Las pruebas de susceptibilidad bacteriana se realizaron mediante la técnica de difusión con discos impregnados, basada en el Método de Kirby-Bauer (Bauer, et al. 1966). El cual consistió en tomar cajas de Petri con agar nutritivo y por medio de un hisopo se

impregnó mediante patrón de estría cada medio de cultivo con las bacterias *S. aureus* y *E. coli*. Las cajas de petri se giraron 90° con el fin de cubrir toda el área de la placa. Posteriormente, se ubicaron 5 discos de papel filtro de 0.5 cm los cuales fueron impregnados con 20 µL de muestra del extracto de estevia (hoja, tallo y hoja agotada). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37° C. Todas las pruebas se realizaron por triplicado, con dos repeticiones.

Del mismo modo, se emplearon 2 cajas de Petri para los controles, uno negativo donde se evaluó el crecimiento de las bacterias sin ningún antibiótico adicionado al medio de cultivo y un control positivo, donde se situaron dos discos de papel filtro impregnados de Oxitetraciclina, antibiótico de amplio espectro. Al finalizar los ensayos se midieron los halos de inhibición de crecimiento de las bacterias.

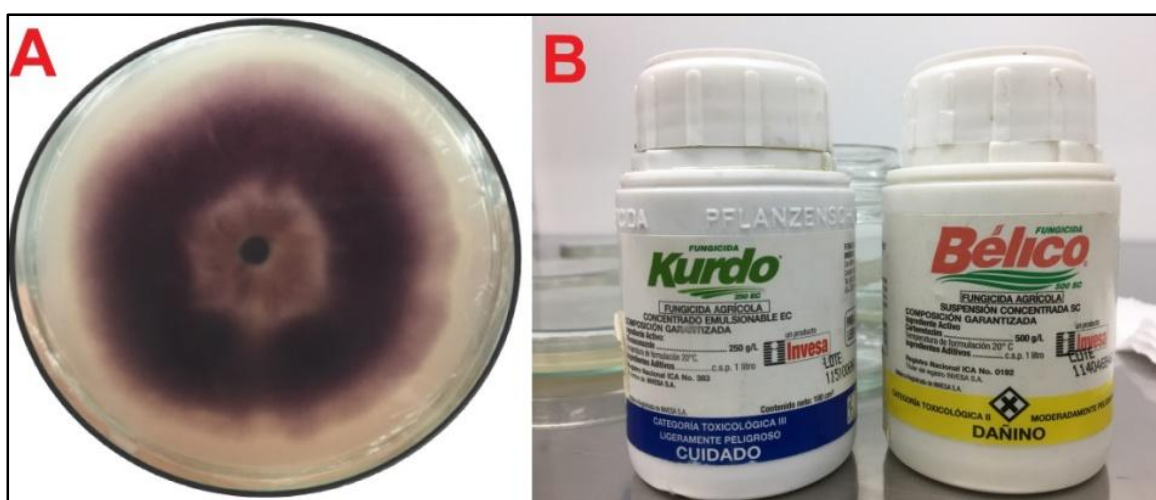
**3.6.2** Actividad Fúngica de los extractos de *Stevia rebaudiana* sobre *Fusarium oxysporum* por el método modificado de pozos de agar. La actividad fungicida se evaluó seleccionando el hongo *Fusarium oxysporum*, el cual tiene una amplia distribución en el mundo y una gran importancia desde el punto de vista agrícola y económico, siendo considerada una de las especies con mayor efecto patológico en las plantas (Torres, G. 2000). *F. oxysporum* UDEAGIEM-15H05, con 8 días de crecimiento se obtuvo del cepario de la línea de Microbiología, del Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM) de la Universidad de Antioquia (Figura 9A).

El método empleado en esta prueba se realizó mediante la técnica de modificación pozo de agar, descrita por Rios, et al., 1988. La cual se evaluó en cajas de Petri con Agar de Papa Dextrosa (PDA), previamente esterilizado, fundido y enfriado a temperatura ambiente. Posteriormente, por medio de una micropipeta se impregnaron cada una de las placas con 100 µL de los extractos de estevia (hoja, tallo y hoja agotada), procurando cubrir toda la superficie de la caja. Con ayuda de un sacabocados se sembraron discos de 0.5 cm del hongo *F. oxysporum* en cada caja de Petri, incubando durante 10 días a temperatura ambiente. Esta técnica se realizó por triplicado.



Simultáneamente, se tomaron 3 cajas de Petri para los controles, uno negativo donde se evaluó el crecimiento del hongo *F. oxysporum* sin ningún fungicida adicionado al medio y otras dos cajas de Petri para el control positivo, impregnadas con fungicidas agrícolas, una con fungicida Kurdo de categoría toxicológica III considerada ligeramente peligroso y otra con fungicida Bélico de categoría toxicológica II considerada moderadamente peligrosa (Figura 9B).

**Figura 9.** (A). Hongo *Fusarium oxysporum* (B). Fungicidas utilizados como control positivo.



Fuente: El autor

Finalmente, se midió el crecimiento radial de la colonia, para poder calcular el porcentaje de inhibición usando la siguiente formula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Díámetro colonia control} - \text{Díámetro colonia tratamiento}}{\text{Díámetro colonia control}} \times 100$$

### 3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron consignados en matrices de cálculo. La actividad antioxidante y fenoles totales fueron sometidos a una curva de regresión lineal, con el fin de establecer las correlaciones entre los diferentes extractos (hoja, tallo y hoja agotada) de *Stevia rebaudiana* variedad morita II.

La actividad bactericida fue descrita de manera cualitativa, observando la presencia de halos de inhibición sobre el crecimiento de la colonia. Por otro lado, para determinar la actividad fungicida se tomaron medidas de los halos de inhibición del crecimiento del hongo. Los datos fueron tabulados y el porcentaje de inhibición se calculó siguiendo la fórmula.

Los datos fueron procesados usando el paquete estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI. Se empleó análisis de varianza de una vía (ANOVA) y test de comparación de múltiples rasgos basado en test de Tukey HSD con un nivel de significancia del 95%.



#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos a partir de hoja, tallo y hoja agotada de plantas de *Stevia rebaudiana* cuentan con propiedades antioxidantes y antimicrobianas, considerados como una fuente natural para la prevención de enfermedades (Landázuri, P. & Tigrero, J. 2009; Durán, A. et al. 2012; Reyes, R. et al. 2014; Cruz, M. 2015).

Existen diferentes solventes como agua, metanol y/o etanol que son empleados en el proceso de extracción de metabolitos en estevia (Macia, E. et al. (sf); Galla, N. et al. 2014; Siddique, A. et al. 2016; Arámbula, M. et al. 2017). En este trabajo se empleó metanol como solvente para la preparación de los extractos, el cual tiene un mayor efecto en la extracción de compuestos bioactivos de *S. rebaudiana*, demostrando un aumento en la acumulación de esteviolglucósidos y compuestos fenólicos (Robles, Á. et al. 2016; Formigoni, M. et al. 2018) y a su vez mayor actividad antioxidante en la inhibición del radical DPPH y ABTS (Zeng, J. et al. 2013; Galla, N. et al. 2014; Ruiz, J. et al. 2015).

Algunos estudios afirman que los extractos de *S. rebaudiana* presentan propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. Las hojas, como producto principal, sirven como agentes terapéuticos en la prevención de enfermedades, a través de su capacidad de eliminar radicales libres (François, N. et al. 2011; Reyes, R. et al. 2014). Asimismo, otros estudios evalúan los extractos a partir de tallo de *S. rebaudiana*, afirmando la presencia de compuestos fenólicos que contribuyen a la actividad antioxidante. Estas investigaciones han revelado que este subproducto podría ser una excelente fuente natural de materiales antioxidantes, aumentando el valor potencial de los desechos del tallo en términos de su viabilidad para aplicaciones comerciales, como en aditivos alimentarios, suplementos para la salud y productos nutraceuticos (Brandle, & Rosa, 1992; Hui et al. 2017).

#### 4.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE HOJA, TALLO Y HOJA AGOTADA DE *Stevia rebaudiana*

En la actualidad existen muchos métodos disponibles para la estimación de la actividad antioxidante (Apak et al. 2016), sin embargo, no existen métodos mundialmente unificados para medir esta capacidad, en parte, debido a la diferencia de condiciones en las cuales se desarrollan estas metodologías, además de la complejidad de los sistemas y de la diversidad de matrices que necesitan ser evaluadas (Londoño, 2012).

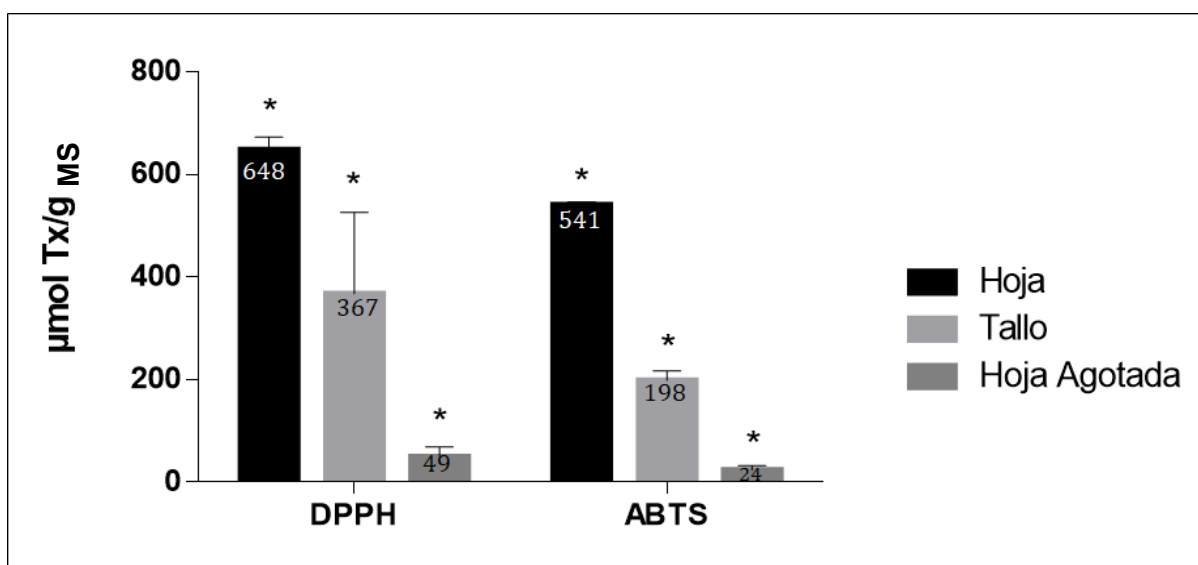
Algunos métodos ampliamente usados, como el ABTS y el DPPH, se fundamentan en la estabilización de radicales libres sintéticos metaestables, cuya reacción con un antioxidante genera un cambio que puede ser detectado instrumentalmente (Londoño, J. 2012), siendo los más populares y comúnmente utilizados debido a su facilidad, velocidad, sensibilidad y el uso de radicales estables (Katarzyna et al. 2015; Can & Baltas, 2016).

En ambos métodos, la actividad antioxidante se determina en cambios de absorbancia de radicales artificiales, estables y coloreados (Can, Z. & Baltas, N. 2016). Por otro lado, múltiples trabajos han empleado el método Folin-Ciocalteu que implica el uso de ácido gálico como compuesto fenólico de referencia, principalmente como complemento de los otros métodos para la medición de la actividad antioxidante (Londoño 2012; Pierre, 2006).

**4.1.1** Cuantificación de la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS. Los resultados de la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de hoja, tallo y hoja agotada en plantas de *S. rebaudiana* indican mayor actividad antioxidante, relacionada con la inhibición de los radicales DPPH y ABTS, en el extracto de hoja (648  $\mu\text{mol Tx/g MS}$  para DPPH y 541  $\mu\text{mol Tx/g MS}$  para ABTS) seguido de los extractos de tallo y hoja agotada (Figura 10). Según Shruti S. et al., 2012, los procesos de extracción en hojas de estevia que emplean metanol como solvente, presentan mayor actividad antioxidante.

Es importante indicar que en este trabajo se reportan valores de actividad antioxidante para los extractos de tallo (367  $\mu\text{mol Tx/g MS}$  para DPPH y 198  $\mu\text{mol Tx/g MS}$  para ABTS) y hoja agotada (49  $\mu\text{mol Tx/g MS}$  para DPPH y 24  $\mu\text{mol Tx/g MS}$  para ABTS), los cuales podrían ser considerados como una alternativa económica de gran interés.

**Figura 10.** Actividad antioxidante en extractos de hoja, tallo y hoja agotada de plantas de *Stevia rebaudiana* con los métodos DPPH y ABTS (eje X), expresados en  $\mu\text{mol Tx/g MS}$  (eje Y). Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas según Test de Tukey con un nivel del 95,0% de confianza.



Fuente: El autor

Ruiz, J. et al (2015), reportaron resultados que se asemejan a los obtenidos en esta investigación, al evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de hoja de dos variedades de *S. rebaudiana* adaptadas a un cultivo en México, con valores de 618.500 a 623.700  $\mu\text{mol Tx}$ , en el ensayo de decoloración con el radical DPPH. Asimismo, algunos autores afirman que los extractos metanólico de las hojas de *S. rebaudiana* presentan una fuerte actividad antioxidante al inhibir el radical DPPH, el radical hidroxilo, el óxido nítrico, el anión superóxido y las actividades de eliminación de peróxido de hidrógeno en comparación con el ácido ascórbico estándar (Tadhani, M. et al. 2007; Shruti, S. et al. 2012).

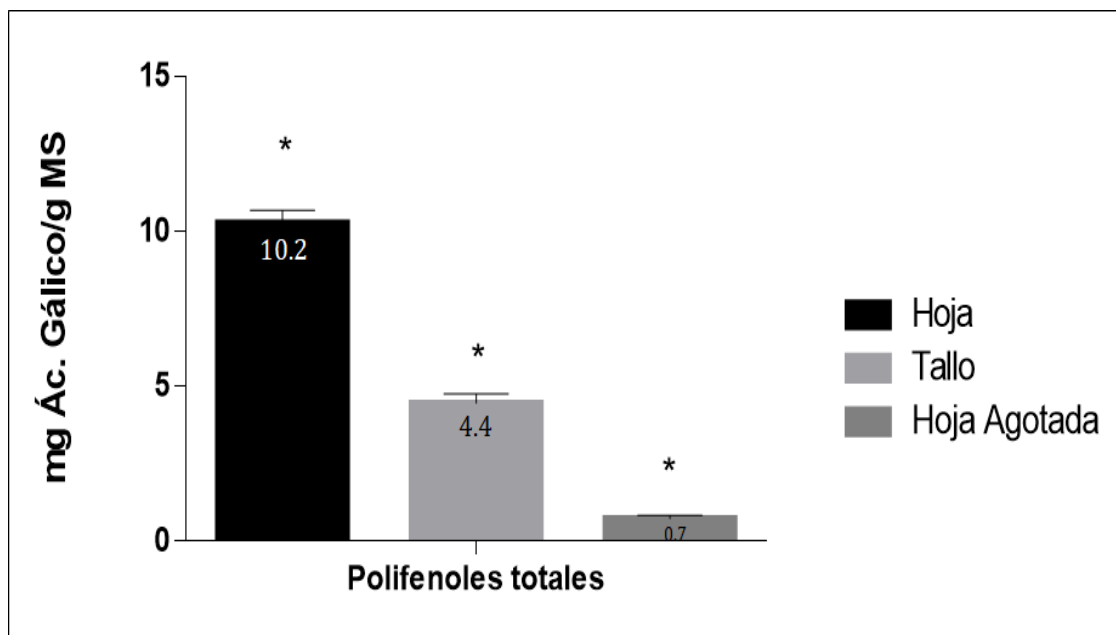
Por otro lado, los reportes de capacidad antioxidante, medida por el ensayo ABTS, en extractos de *S. rebaudiana*, afirman que esta actividad se relaciona directamente con el contenido de compuestos fenólicos totales, lo que indica que los extractos con mayor contenido de fenoles totales presentan valores más altos de actividad antioxidante (Žlabur, J. et al. 2015). Varios autores utilizan este método, siendo uno de los más eficientes para la identificación de glucósidos y fenoles, evaluando la capacidad antioxidante de los extractos vegetales (Leja, M. et al. 2007; Nabors, 2012).

Shruti et al. 2012, plantean resultados similares al evaluar los extractos metanólicos en diferentes tejidos de *S. rebaudiana*, por medio de los métodos DPPH y ABTS, donde se identificaron altas cantidades de fenoles, flavonoides y taninos, especialmente en raíz ( $642.30 \pm 83.50 \mu\text{mol Tx}$ ) seguido de hoja ( $562.60 \pm 168.70 \mu\text{mol Tx}$ ) y tallo ( $492.80 \pm 128.70 \mu\text{mol Tx}$ ). No obstante, es importante resaltar la falta de información sobre las propiedades antioxidantes de los extractos de tallo y hoja agotada, lo cual se convierte en una limitante, ya que como se evidenció en este trabajo, estos materiales presentan un valor agregado como antioxidantes naturales, aportando información para establecer la bioprospección de la planta.

**4.1.2** Cuantificación del contenido de compuestos fenólicos por el método Folin-Ciocalteu. Los resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos de los extractos de *Stevia rebaudiana*, por medio del método Folin-Ciocalteu, indican mayor actividad antioxidante en los extractos de hoja con valores de 10.2 mg Ác. Gálico/g MS, seguido de los extractos de tallo y hoja agotada (Figura 11).

A pesar que en el proceso de extracción, el tallo y hoja agotada son considerados desechos, en este trabajo se reporta una actividad antioxidante de 4,4 mg Ác. Gálico/g MS para los extractos de tallo y 0,7 mg Ác. Gálico/g MS para hoja agotada, lo cual podría generar un mayor interés en la evaluación de estos subproductos para su uso y comercialización (Figura 11).

**Figura 11.** Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos (eje X) en extractos de hoja, tallo y hoja agotada de plantas de *Stevia rebaudiana* con el método Folin-Ciocalteu, expresados en mg Ác. Gálico/g MS (eje Y). Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas según Test de Tukey con un nivel del 95,0% de confianza.



Fuente: El autor

Katarzyna, G. et al. 2015, obtuvieron resultados similares a los de este trabajo, evaluando el contenido de fenoles totales de las hojas de *S. Rebaudiana* con un total de 15.50 mg Ác. Gálico/g de muestras secas con el método de Folin-Ciocalteu, considerándola como fuente multifuncional de antioxidantes naturales. Trabajos como estos, confirman la presencia de compuestos fenólicos en las plantas, teniendo un efecto importante para la estabilidad oxidativa y la seguridad antimicrobiana, aumentando el interés de las funciones bioquímicas protectoras de los antioxidantes naturales presentes en las plantas medicinales (Tadhani et al. 2007; Shruti et al. 2012; Zeng et al. 2013).

A pesar de los pocos reportes de la actividad antioxidante en tallo y hoja agotada de *S. rebaudiana*, se destaca el trabajo de Bondarev et al. 2003, donde cuantifican la presencia de polifenoles en las diferentes partes de la planta de *S. rebaudiana*, indicando mayor

actividad antioxidante en hojas y tallos maduros durante la fase de brotación y el inicio de la floración. Por otro lado, Zeng et al., 2013, evaluaron la actividad antioxidante de los extractos de partes aéreas (tallos y hojas) de cuatro líneas seleccionadas de *S. rebaudiana*, reportando el contenido total de compuestos fenólicos presentes con un promedio de 55.64-58.35 mg Ác. Gálico/g peso seco, por medio del método Folin-Ciocalteu, esto concluye que los compuestos fenólicos, flavonoides y las capacidades antioxidantes en las hojas de *S. rebaudiana* fueron de dos a cinco veces más altos en comparación a los tallos.

Por último, los compuestos fenólicos contribuyen directamente con la acción antioxidante, desempeñando un papel preventivo en múltiples enfermedades, neutralizando los radicales libres (causantes del cáncer, enfermedades cardiovasculares y la diabetes) presentes en la sangre, actuando como captadores de oxígeno, sin mostrar efectos secundarios tóxicos, es por esto, que el interés en este tipo de plantas con dichos compuestos aumenta de manera progresiva, ya que estas pueden contribuir a la industria alimentaria con la degradación oxidativa de los lípidos mejorando la calidad y el valor nutricional de los alimentos (Duh et al., 1999; Kahkonen et al., 1999; Aneta et al., 2007; Suk J. et al., 2011; Lemus R. et al., 2012).

#### **4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE HOJA, TALLO Y HOJA AGOTADA DE *Stevia rebaudiana*.**

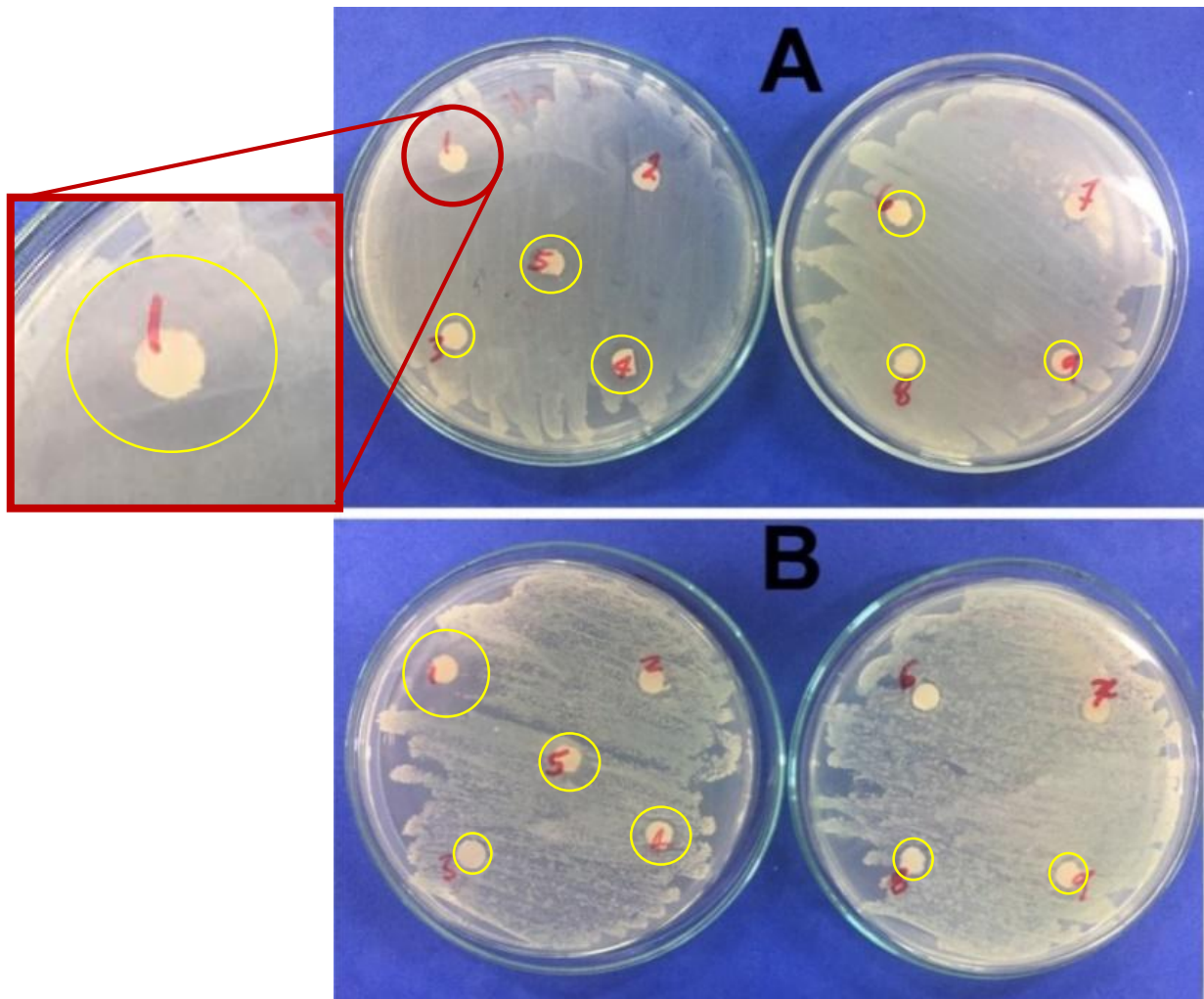
El uso de los extractos naturales ha sido empleado para fines en el área de los alimentos, la cosmetología y la medicina, principalmente enfocado en curar o prevenir enfermedades. Estos proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevos fármacos que puedan controlar el crecimiento o el desarrollo de agentes microbianos, por esta razón, se requiere más estudios que identifiquen los principios activos de las plantas con el fin de realizar diversos ensayos biológicos y obtener información sobre la capacidad antimicrobiana del compuesto de interés, teniendo en cuenta las diferentes concentraciones en las que esta puede actuar ante los microorganismos (Ncube et al., 2008; Taroco et al., 2006; Sánchez G. et al., 2016).

Las pruebas de susceptibilidad microbiana son técnicas esenciales en la investigación y los resultados pueden variar dependiendo de una gran cantidad de factores involucrados en el desarrollo de las mismas. Estos ensayos deben estar estandarizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad y aunque no existe una reglamentación y/o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de los extractos de plantas, la mayoría de los métodos se basa en evaluar la resistencia y/o susceptibilidad en antibióticos (Cowan M., 1999; Bakht N. et al., 2015; Sánchez G. et al., 2016).

En este sentido, se evaluó la capacidad antimicrobiana de los extractos de hoja, tallo y hoja agotada de *S. rebaudiana*, con el fin de aportar información e impulsar a la investigación de estos subproductos que son considerados como desechos en el proceso de extracción, dando un valor agregado a este material vegetal.

**4.2.1 Actividad Bactericida sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.** Los resultados de la evaluación de la actividad bacteriana de los extractos metanólicos de *Stevia rebaudiana* en hoja, tallo y hoja agotada sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* por medio del método de difusión en Disco (Kirby-Bauer), evidenciando un efecto bacteriostático frente a los tres tratamientos empleados (hoja, tallo y hoja agotada), ya que previenen el crecimiento de las bacterias, es decir, las mantiene en la fase estacionaria de crecimiento sin matar por completo la bacteria (Figura 12).

**Figura 12.** Actividad bacteriostática con el método de difusión en Disco con extractos de hoja (1, 2, 4), tallo (5, 6, 8) y hoja agotada (3, 7, 9) de plantas de *Stevia rebaudiana*, sobre (A) *Escherichia coli* y (B) *Staphylococcus aureus*.



Fuente: Autor

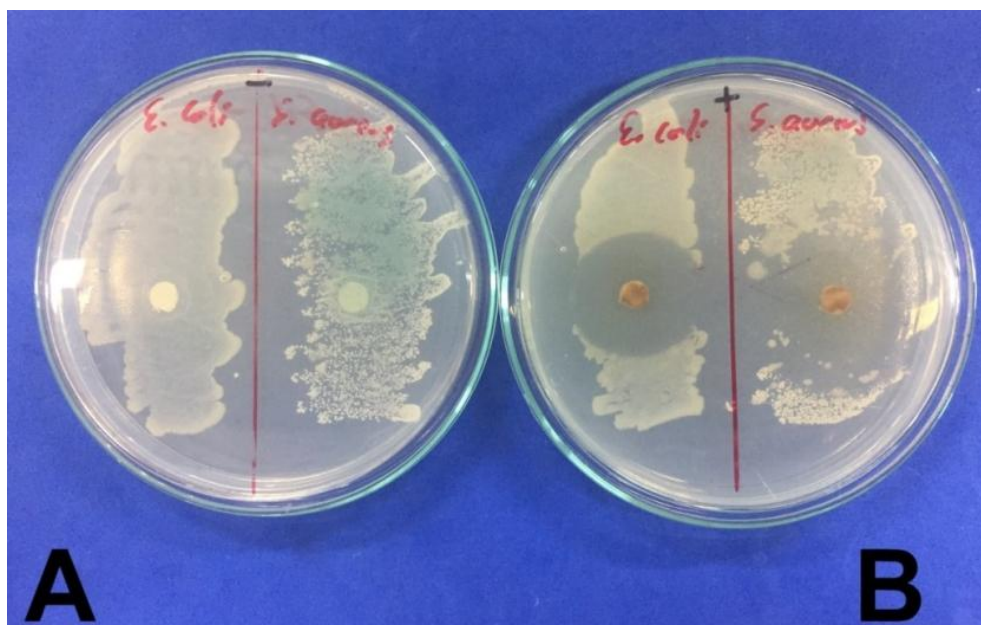
Algunos estudios, demuestran como *S. aureus* y *E. coli* son las principales bacterias que afectan la población humana, desarrollando resistencia frente a los antibióticos tales como la meticilina, penicilinas de amplio espectro, entre otros (Donnenmberg M., 2002; Koneman E. et al., 2008; Murray P., 2006; Gil M. et al., 2016). Con respecto a lo anterior, se ha optado por la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas y de bajo costo donde se investiguen las acciones, efectos y posibles usos de los extractos de *Stevia*



*rebaudiana* sobre bacterias frecuentemente resistentes a los antibióticos comerciales, como se reporta en este trabajo, donde se evidencia una mayor actividad bacteriostática en los extractos de hoja con medidas de 9mm (disco 1), 5mm (disco 4 y 5), y los extractos de tallo con 3mm (disco 3, 8 y 9), demostrando los posibles usos que puede tener, siendo una alternativa para los tratamientos o prevención de las enfermedades producidas por estas bacterias.

Al mismo tiempo, en las placas de los controles se evidencia la viabilidad para ambas bacterias en el control negativo (sin antibiótico) y un crecimiento nulo en el control positivo con Oxitetraciclina (antibiótico) (Figura 13).

**Figura 13.** Antibiograma de control con el método de difusión en Disco Kirby-Bauer, sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, (A) control negativo y (B) control positivo.



Fuente: Autor

Por otro lado, algunos estudios confirman la importancia de estas bacterias debido a las patologías que se desarrollan, como las infecciones cutánea y de mucosa, así como enfermedades de riesgo vital (absceso, foliculitis, pericarditis, peritonitis, celulitis entre

otros) producidas por *S. aureus* y en *E. coli* se evidencia infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves (Koneman E. et al., 2008; Torres M. et al., 2002).

Manish B. & Rema S., 2006 reportan la actividad antimicrobiana de las hojas de *S. rebaudiana* en extractos de metanol y acetato de etilo, ya que tienen actividades más o menos similares, esto indica que los extractos de hoja de estevia tienen actividades inhibitorias contra microorganismos, aunque sus actividades antibacterianas son menores que las del antibiótico ciprofloxacina. Igualmente, Sumit G., et al. 2008, aportan información básica sobre los antibióticos de origen vegetal, evaluando la actividad antimicrobiana de extractos de hoja de estevia contra 10 patógenos, siendo lo suficientemente potente para inhibir el crecimiento contra patógenos de animales como *S. aureus* y *E. faecalis*.

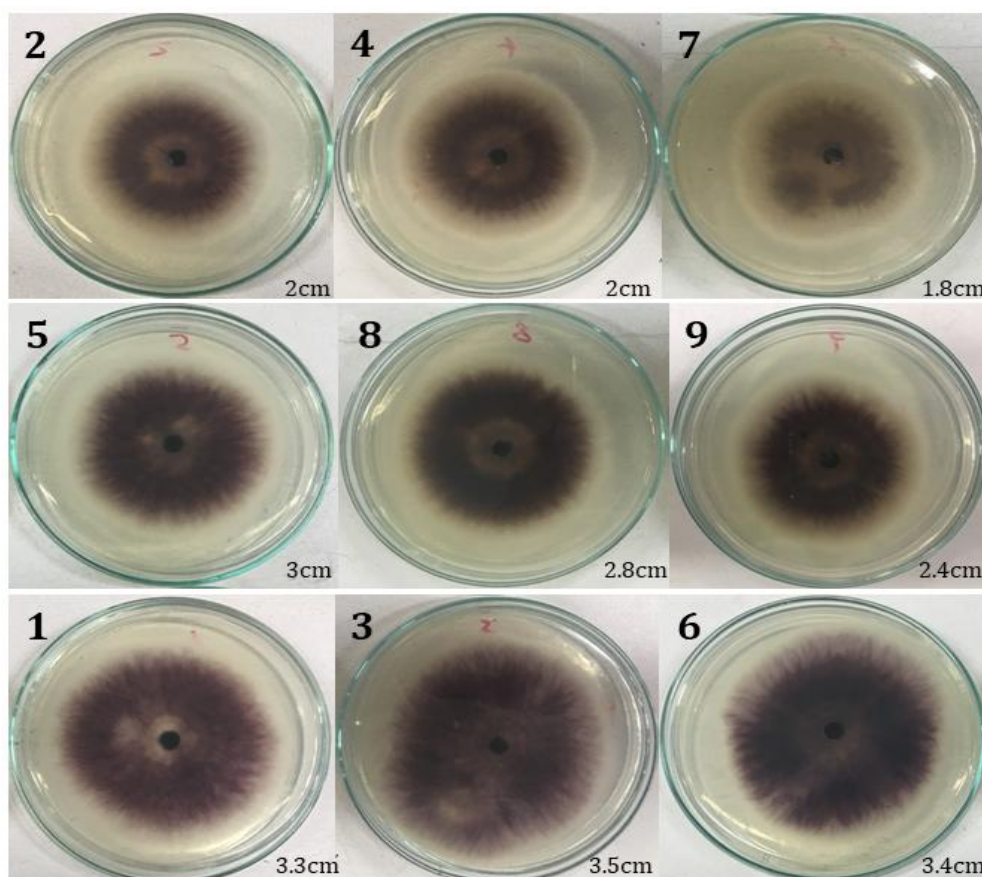
Arámbula M., et al., 2017, evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos de *S. rebaudiana* Bertoni contra *S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. aeruginosa*; bajo el método de difusión en disco, determinando la importancia de los metabolitos secundarios presentes en la planta, logrando inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos; es así como estos compuestos contenidos en los extractos de *S. rebaudiana* pueden ser candidatos potenciales como medicamentos farmacéuticos contra bacterias resistentes a antibióticos.

Con lo anterior, se puede suponer que stevia tiene propiedades bacterianas debido a los resultados obtenidos donde se evidencio la formación de un halo inhibitorio durante los primeros momentos del ensayo. La literatura notifica la importancia y las propiedades de la hoja de *S. rebaudiana*, sus actividades inhibitorias contra microorganismos lo cual indican que pueden ser un candidato ideal para futuras investigaciones sobre sus usos en la conservación de alimentos, productos farmacéuticos y productos naturales a base de plantas (Manish B. & Rema S., 2006; Tovar G. & Cupé A., 2016), sin embargo, es nula la información con respecto a la acción antimicrobiana ejercida por extractos de tallo y hoja agotada, como se evidenció en este trabajo, siendo esta una posible solución para el uso de nuevos compuestos antimicrobianos, ya que cada día hay un aumento en la

incidencia de nuevas enfermedades infecciosas y el desarrollo de resistencia a los antibióticos.

**4.2.2 Actividad Fungicida sobre *Fusarium oxysporum*.** Los resultados de la actividad fungicida de los extractos de hoja, tallo y hoja agotada de plantas de *S. rebaudiana* fueron evaluados mediante la modificación de pozos de agar PDA midiendo el porcentaje de inhibición (Figura 14). Al finalizar los ensayos se evidenció mayor actividad fungicida ejercida por el extracto de hoja con 20mm (50% inhibición), seguida del extracto de tallo con 30 mm (28% inhibición) y extracto de hoja agotada con 35 mm (12% inhibición) (Figura 15).

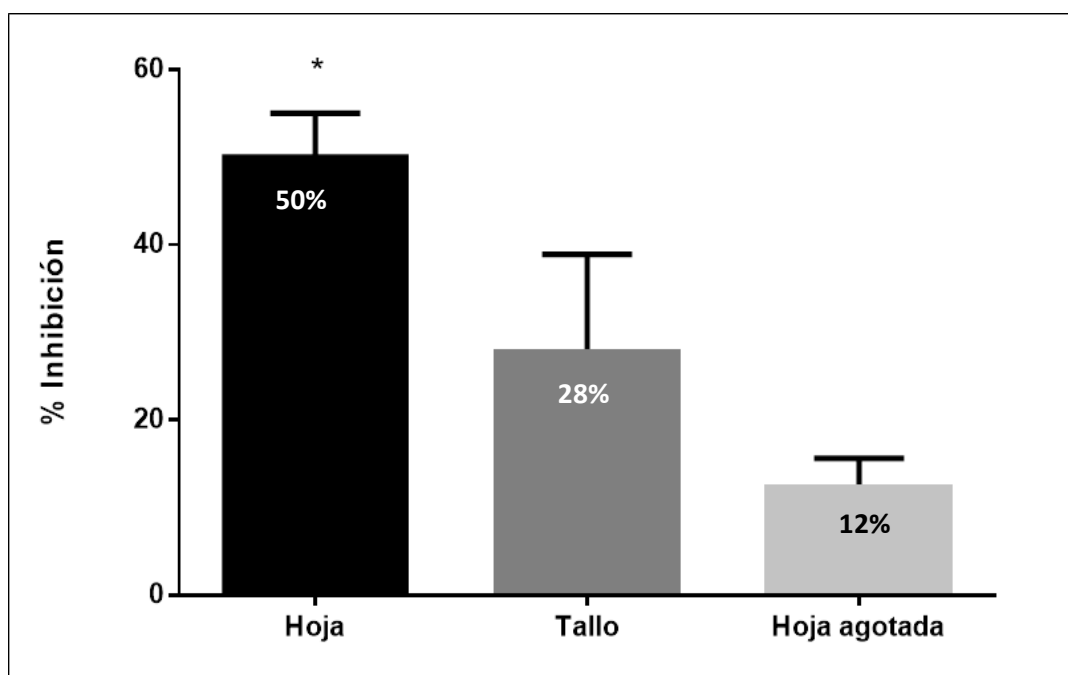
**Figura 14.** Actividad fungicida con el método de modificación de pozos de agar PDA, con extractos de hoja (2, 4, 7), tallo (5, 8, 9) y hoja agotada (1, 3, 6) de plantas de *Stevia rebaudiana*.



Fuente: El autor

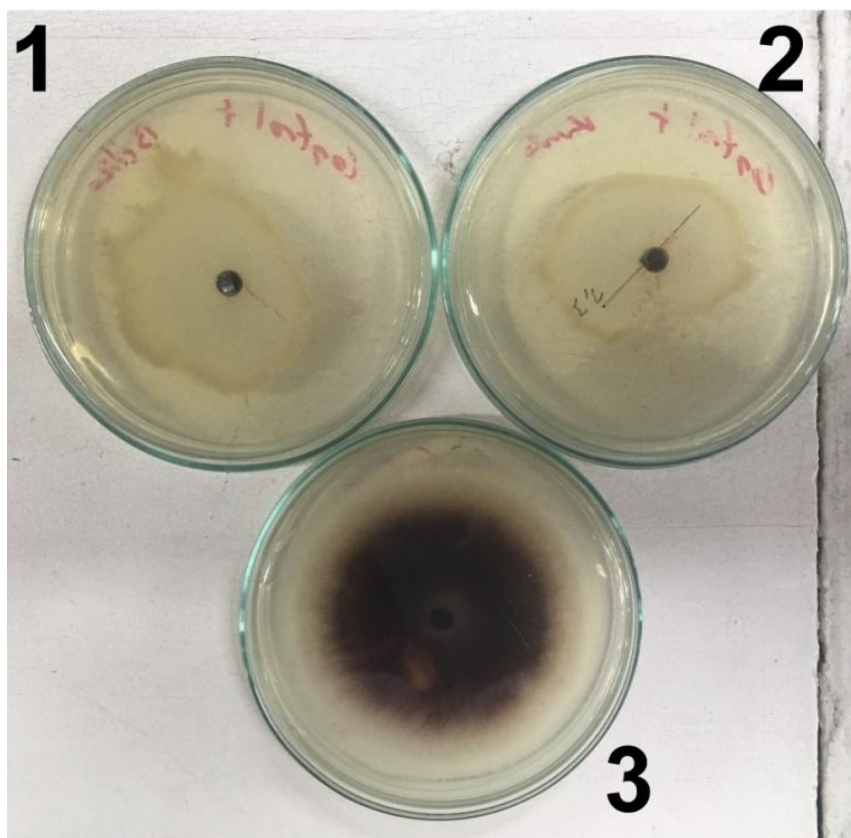
Asimismo, comparando la actividad fungicida de los extractos de estevia con respecto a los controles (control positivo 100% inhibición), estos presentan un resultado Fungistático lo que indica la capacidad de suspender el crecimiento y el desarrollo de los hongos o la germinación de sus esporas. A diferencia de los fungicidas, estos no matan a los hongos, sin embargo su crecimiento es más lento. De esta manera, se evaluó el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, tomando dos fungicidas para el control positivo, uno ligeramente peligroso (Kurdo) y otro moderadamente peligroso (Bélico), por otro lado, se tomó una placa sin fungicida para el control negativo, evaluando el crecimiento normal del hongo en el medio de cultivo (Figura 16).

**Figura 15.** Actividad fungicida en extractos de hoja, tallo y hoja agotada (eje X) de plantas de *Stevia rebaudiana* con el método de modificación de pozos de agar PDA, expresados en porcentaje de inhibición (%) (eje Y). El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa según Test de Tukey con un nivel del 95,0% de confianza.



Fuente: Autor

**Figura 16.** Actividad fungicida de control mediante la modificación de pozos de agar PDA, sobre *Fusarium oxysporum*, (1) Control positivo para Bérico, (2) Control positivo para kurdo y (3) control negativo sin fungicida.



Fuente: Autor

Estudios alrededor del mundo, revelan la actividad biológica de algunos metabolitos secundarios presentes en las plantas, mencionan algunos de ellos que presentan actividad biológica importante, tales como: alcaloides, terpenos, flavonoides, cumarinas (Zhou K. et al., 2009; Zamora F. et al., 2008; Guerra M. et al., 2004). La importancia de los productos naturales se basa, no solamente en sus efectos farmacológicos o quimioterapéuticos, sino en la posibilidad que ofrecen para poder desarrollar a partir de sus estructuras nuevos fármacos, que pueden brindar una alternativa promisoriosa para el control de plagas y enfermedades sin ser tóxicos para el organismo (García H. et al., 2015).

Asimismo, se dilucidan las alternativas para el control de enfermedades causadas por los hongos del género *Fusarium*, los cuales son incidentes en diversos cultivos con importancia agrícola y resistentes a los plaguicidas comunes, basándose en nuevos compuestos derivados de fuentes vegetales, como aceites esenciales y extractos vegetales, siendo más seguros para los consumidores y el medioambiente (Jasso D. et al., 2007; Joseph B. et al., 2008; Usha K. et al., 2009; Akila R. et al., 2011; Villa M. et al., 2015).

Villa M. et al., 2015, afirma las implicaciones negativas acerca del uso inadecuado de plaguicidas y sus efectos secundarios, tanto en el costo de estos, la resistencia de patógenos, el desgaste ambiental y el peligro a la salud pública, estos factores implican que se desarrollen nuevos sistemas de gestión para reducir la dependencia de los plaguicidas sintéticos.

También es importante resaltar, la falta de información en Colombia y a nivel mundial frente a la efectividad de las propiedades de *S. rebaudiana*, para el control de las enfermedades causadas por los hongos del género *Fusarium*, siendo una alternativa el uso de extractos con propiedades naturales para controlar o evitar el crecimiento de patógenos como este, considerado como una amenaza para diferentes cultivos en el mundo.

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo evidencian la presencia de antioxidantes naturales y antimicrobianos que se pueden obtener a partir de extractos de tallo de plantas de *Stevia rebaudiana*, con la posibilidad de reutilizar este subproducto considerado como residuo en el proceso de extracción representando beneficios no sólo económicos sino ambientales.

*Stevia rebaudiana* cuenta con una amplia gama de compuestos fenólicos que contribuyen a la actividad antioxidante y antimicrobiana, los extractos de tallo y hoja agotada pueden ser una alternativa para contrarrestar radicales libres y agentes microbianos causantes de enfermedades en animales y plantas.

Los extractos de hoja de *S. rebaudiana* presentan mayor actividad antioxidante, en comparación con los tratamientos de tallo y hoja agotada, para los tres métodos empleados (DPPH, ABTS y Folin ciocalteu).

Los extractos de hoja y tallo de *S. rebaudiana* presentan actividad bacteriostática frente a las bacterias *E. coli* (-) y *S. aureus* (+), lo cual puede ser una iniciativa para darle un valor agregado a estos subproductos, que son considerados como desechos.

Los extractos de hoja de *S. rebaudiana* presentaron un 50 % de inhibición del crecimiento del hongo *F. oxysporum*, en comparación con los tratamientos de tallo y hoja agotada.

Los resultados con hoja agotada son de gran importancia debido a la inexistencia de estudios frente a la evaluación de este subproducto, por lo que estos datos se convierten en un aporte único para la reutilización de los residuos de la extracción de *S. rebaudiana* con el fin de establecer la bioprospección de este material.

## RECOMENDACIONES

Se propone realizar más investigación, para tener una base de datos completa sobre *Stevia rebaudiana* variedad morita II en Colombia y potencializar su cultivo.

Se recomienda evaluar los extractos de tallo y hoja agotada de *S. rebaudiana*, haciendo estudios de los diferentes métodos de la actividad antioxidante a diferentes concentraciones. Asimismo proyectos encaminados hacia la evaluación de los extractos de tallo y hoja agotada de estevia, frente a la actividad antimicrobiana que permita potencializar el efecto fungicida y bactericida, utilizando un rango más amplio de hongos y bacterias de importancia económica para cultivos.

Existe una amplia información sobre los beneficios de las hojas de *Stevia rebaudiana*, pero es poca la investigación que se tiene en Colombia, en especial de las partes que son consideradas como desechos (Tallo y hoja agotada) desaprovechando una alternativa con potenciales antioxidantes y microbianos.



## REFERENCIAS

- Adebolu, T. & Oladimeji, S. (2005). Antimicrobial activity of leaf extracts of *Ocimum gratissimum* on selected diarrhoea causing bacteria in southwestern Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* 4 (7): 682-684.
- Akila, R.; Rajendran, L.; Harish, S.; Saveetha, K.; Raguchander, T. & Samiyappan, R. (2011). Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum f. sp. Cubense* (Foc) causing *Fusarium* wilt in banana. *Biological Control*, 57(3), 175-183.
- Ames, S.; Shigenaga, M. & Hagen T. (1993) Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. *Proc Natl Sci USA*; (90): 7915-7922.
- Aneta, W.; Jan, O. & Renata C. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, pp. 940-949
- Anton, S.; Martin, C.; Han, H.; Coulon, S.; Cefalu, W.; Geiselman, P. & Williamson, D. (2010). *Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels*. *Appetite*, 55(1), 37–43. Recuperado de <http://doi.org/10.1016/j.appet.2010.03.009>
- Apak, R.; Özyürek, M.; Güçlü, K. & Çapanoğlu E. (2016) Antioxidant activity/capacity measurement. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J Agric Food Chem* 64:997–1027.
- Arámbula, M.; Alvarado, M.; Sánchez, M.; Xochipa, I.; Cortés, A. & Hilerio S. (2017). Actividad antibacteriana de extractos de *Stevia rebaudiana Bertoni* contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11 (25), 414-418.
- Arámbula, M.; Alvarado, M.; Sánchez, M.; Xochipa, I.; Cortés, A. & Hilerio S. (2017). Antibacterial activity of extracts of *Stevia rebaudiana Bertoni* against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(25), 414-418. Recuperado de <https://doi.org/10.5897/JMPR2017.6373>

- Arbeláez, T. (2000). Algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporu*. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Vol.17: 11-22.
- Avello, M. & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* (Concepción), (494), 161-172. Recuperado de <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>.
- Bakht, N.; Humaira, F.; Madiha, A. & Haq I. (2015). Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources. *Austin J Microbiol*
- Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. & Turck M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.* 45:493-6. [Depts. Microbiology and Medicine, Univ. Washington, Sch. Med., Seattle. WAI.
- Bergman, M.; Varshavsky, L.; Gottlieb, H. & Grossman, S. (2001). The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. *Phytochemistry*; (58): 143-152.
- Blois, M. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181: 1199- 1200
- Bondarev, N.; Sukhanova, M.; Reshetnyak, O. & Nosov A. (2003) Steviol Glycoside Content in Different Organs of *Stevia rebaudiana* and Its Dynamics during Ontogeny. *Biologia Plantarum* 47: 261. Recuperado de <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000022261.35259.4f>
- Brandle, J. & Rosa, N. (1992) Heritability for yield, leaf:stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Can. J. Plant Sci.* 72: 1263-1266. *Canadian Journal of Plant Science* , 72 (4): 1263-1266, Recuperado de <https://doi.org/10.4141/cjps92-159>
- Brandle, J. & Telmer, P. (2007). *Steviol glycoside biosynthesis*. *Phytochem.* 68, 1855-1863. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved. DOI:10.1016/j.phytochem.2007.02.010.
- Cameron, E. & Pauling. (1978). *Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer*. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol 75, no. 9. p. 4538 - 4542.

- Can, Z. & Baltas, N. (2016) Bioactivity and enzyme inhibition properties of *Stevia rebaudiana*. *Curr Enzym Inhib* 12:188–194. doi: 10.2174/1573408012666160402001925
- Chaves, T.; Pinheiro, R.; Melo, E.; Soares, M.; Souza, J.; de Andrade, T.; ... & Coutinho, H. (2018). El aceite esencial de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potencia la actividad de la  $\beta$ -lactama contra las cepas resistentes a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Cultivos y productos industriales* , 112 , 70-74.
- Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-82. Recuperado de [http://doi.org/0893-8512/99/\\$04.0010](http://doi.org/0893-8512/99/$04.0010).
- Cruz, M. (2015). *Revisión bibliográfica Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni*. *Cultivos Tropicales*, vol. 36, no. especial, pp. 5-15. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v36s1/ctr01s115.pdf>.
- Daymy, A.; Monica, S.; Regina, L.; Guiseppe, M. & Anna, F. (1999). “*Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos*”. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos y Instituto Nacional de Nutrición de Italia *Rev. Cubana Aliment Nutr*: 13.2: 104-1. Consultado el 10 de Julio del 2017. Recuperado de [http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol13\\_2\\_99/ali04299.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol13_2_99/ali04299.pdf).
- Díaz, S. & Vernon, C. (1999). Inocuidad Microbiológica de Frutas Frescas y Mínimamente Procesadas. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* 2:133-136.
- Donnenmberg, M. (2002) *Escherichia coli*: virulence mechanisms of a versatile pathogen. Elsevier Science Edition, Academic Press, San Diego, Calif.
- Dorman, H. & Hiltunen, R. (2004) Fe (III) reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja Hortensis* L.) extract and subfractions. *Food chemistry*; 88:193-199.
- Duh, P.; Tu, Y. & Yen, G. (1999). Antioxidant activity of water extract of Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 32 pp. 269-277.
- Durán, A.; Rodríguez, N.; Córdón, A. & Record, C. (2012). *Stevia (stevia rebaudiana)*, non-caloric natural sweetener. Universidad Autónoma de Chile. Ricardo Morales 3369, San Miguel Santiago de Chile.

- Edelsztein, V. (2011). Los remedios de la abuela: mitos y verdades de la medicina casera. 1a ed. Buenos Aires, Argentina: Siglo Veintiuno Editores.
- Erdogrul, O. (2002). Antibacterial activities of some plant extracts used in folk medicine. *Pharmacol. Biol.* 40: 269–273.
- Escalona, J. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. como premisa para su introducción en la medicina complementaria. Universidad de Oriente. Facultad de Ciencias Naturales. Departamento de Farmacia. Recuperado de [http://tesis.repo.sld.cu/355/1/Julio\\_C%C3%A9sar\\_Escalona.pdf](http://tesis.repo.sld.cu/355/1/Julio_C%C3%A9sar_Escalona.pdf).
- Etherton, P.; Hecker, K.; Bonanome, A.; Coval, S.; Binkoski, A. & Hilpert, K. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*; 113 (Suppl. 9B): 71S-88S.
- Faizi, S.; Rasool, N.; Rashid, M.; Ali Khan, R.; Ahmed, S.; Khan, S.; Ahmad, A.; Bibi, N. & Ahmed, S. (2003). Evaluation of the antimicrobial property of *Polyalthia longifolia* var. *pendula*: isolation of a lactone as the active antibacterial agent from the ethanol extract of the stem. *Phytother. Res.* 17(10): 1177 - 1181.
- Farr, D.; Bills, G.; Chamuris, G. & Rossman, A. (1989). Fungi on plants and plant products in the United States. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota.
- Formigoni, M.; Giménez, P.; Silva, A.; Santos, V.; Benossi, L.; Dacome, A.; Pilau, E. & Costa, S. (2018). Pretreatment with ethanol as an alternative to improve steviol glycosides extraction and purification from a new variety of stevia. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.022>.
- François, N.; Rachid, S.; Babakar, D. & Amadou, D. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. Paul Verlaine University, France. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.002>.
- Galla, N.; Pamidighantam, P.; Karakala, B. & Akula, S. (2014). Antioxidant Activity of *Stevia (Stevia rebaudiana* L.) Leaf Powder and a commercial Stevioside Powder.

Central Food Technological Research Institute, Resource Centre, Habshiguda, Uppal Road, Hyderabad (CSIR). India.

- Garcia, D.; Ramos, J.; Sanchis, V. & Marín S. (2012). Effect of *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts on growth and mycotoxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in maize seeds as affected by water activity. Food Technology Department, Lleida University, XaRTA-TPV, Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain.
- García, H.; Oranday, C.; Verde, S.; Quintanilla, L.; Leos, R.; Garza, G. & Rivas, M. (2015). Actividad fungicida, antioxidante e identificación de los compuestos más activos de 20 plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 46, núm. 3, pp. 73-79 Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. Distrito Federal, México.
- Gasmalla, M.; Yang, R.; Musa, A.; Hua, X. & Ye, F. (2014) Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted *rebaudioside A* from stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves. Arab. J. Chem., Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.06.012>.
- Gerber, M.; Ruault, M.; Hercberg, S.; Riboli, E.; Scalbert, A. & Siess, M. (2002). Food and cancer: state of the art about the protective effect of fruits and vegetables. Bull Cancer; (89): 293-312.
- Gil, M.; Gonzalez, M.; Orlandi, O.; Ugas, K.; Nicita, G. & Perozo, E. (2016). Actividad bacteriostática y bactericida de extractos etanólicos de propóleos venezolanos y europeos sobre *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*. Departamento de Microbiología, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo, Venezuela. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/311804886>.
- Gómez, A.; Corredor, M. & Peláez, C. (2015). *Fusarium oxysporum* patógeno trans-reino, inhibido por la hemolinfa de larvas de galleria mellonella. Revista politécnica, 10(18), 35 - 45. Recuperado de <http://revistas.elpoli.edu.co/index.php/pol/article/view/374/540>

- Guerra, M.; Rodríguez, M.; García, G. & Llerena, C. (2004). Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf. Rev cubana plant med; 9(2)
- Guerrero, R. (2005). Planta endulzante con mucho futuro. Diario La Prensa. Nicaragua. Jueves 14 de abril de 2005.
- Gulçin, I.; Berashvili, D. & Gepdiremen, A. (2005). Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. J Ethnopharmacol; 101(1-3): 287-93.
- Gyamfi, M.; Yonamine, M. & Aniya, Y. (2002). Acción de eliminación de radicales libres de hierbas medicinales de *Ghana Thonningia sanguinea* en lesiones hepáticas inducidas experimentalmente. Gen Pharmacol. Recuperado de <https://bibliored.ut.edu.co:2061/science/article/pii/S0940299311000224#bib0070>
- Hald, T.; Aspinall, W.; Devleeschauwer, B.; Cooke, R.; Corrigan, T.; Havelaar, A.; & col. (2016) Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud sobre las contribuciones relativas de los alimentos a la carga de morbilidad debida a los peligros transmitidos por los alimentos: una elicitación estructurada de expertos. PLoS One; 11: e0145839.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med; (91):14-22.
- Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. Nut Res (55): 544-552.
- Hammer, K.; Carson, C. & Riley, T. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plants extracts. Journal of Applied Microbiology, 86, pp. 986-990.
- Hernández, D. & Rodríguez, J. (2001). Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en cuba. Rev. Cubana plant med.May-Ago (2): 44-27. Recuperado de <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/3521/1/B-ESPE-000801.pdf>.
- Hui, Y.; Yang, G.; Minoru, S.; Toshiyasu, Y.; Toshiki, N. & Yinci, X. (2017). Antioxidant activities of aqueous extract from *Stevia rebaudiana* stem waste to inhibit fish oil oxidation and identification of its phenolic compounds. Food Chemistry. Elsevier. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.004>.

- Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves. Arab. J. Chem. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.06.012>.
- Ismet, A.; Mohammad, M.; Hemayet, H.; Ishrat, N.; Abdus, S.; Abdul, A. & Syed M. (2010). Antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* Bert. Leaves from Bangladesh. Chemical Research Division, Bangladesh Council of Scientific and Industrial Research. Dhaka College, National University, Mirpur Road, Bangladesh. Vol. 13, No. 2, ISSN 0301-4606.
- Jarma, A. (2008). Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. Rev. Colomb. Cienc. Hortíc. 2(1), 109-120.
- Jasso, D.; Castillo, D.; Sanchez, J.; Garcia, R.; Quintanilla, J. & Saldivar, R. (2007) Antifungal activity in vitro of *Flourensia* spp. Extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Ind. Crops Products* , 25, 111–116.
- Jasso, D.; Hernandez, C.; Angulo, S.; Rodríguez, G.; Villarreal, Q. & Lira, S. (2007). Antifungal activity in vitro of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products*, 25(2), 111-116.
- Jenet, A. (1996). Die Substoffpflanze *Stevia rebaudiana* Bert. 81p.
- Jones, RE.; Stall & T.A. Zitter. (1997). Compendium oftomato diseases. The American Phytopathological Society Press. St. Paul..
- Joseph, B.; Dar, M. & Kumar, V. (2008). Bioefficacy of plant extracts to control *Fusarium solani* f. sp. *melongenae* incitant of brinjal wilt. *Global Journal of Biotechnology y Biochemistry*, 3(2), 56-59.
- Kahkonen, M.; Hopia, A.; Vuorela, H.; Rauha, J.; Pihlaja, K.; Kujala, T. & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, pp. 3954-3962.
- Katarzyna, G.; Tomasz, B.; Zofia, N.; Beata, A.; Anna, J.; Monika, K. & Kamila, R. (2015). *Stevia Rebaudiana* Bert. Leaf Extracts as a Multifunctional Source of Natural Antioxidants. Department of Public Health, Dietetics & Lifestyle Disorders, The

University of Information Technology and Management in Rzeszow, Poland.  
doi:10.3390/molecules20045468

- Koneman, E.; Winn, W. & Allen, S. (2008). Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana 6ta ed. Madrid. España.
- Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V. & Milos, M., (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil, Food Chem, 85: 633–640.
- Landázuri, P. & Tigrero, J. (2009). *Stevia rebaudiana BERTONI , UNA PLANTA MEDICINAL*. Bol. Téc. Edición Especial. ESPE. Sangolquí, Ecuador.
- Landázuri, P. & Tigrero, J. (2009). *Stevia rebaudiana Bertoni, una planta medicinal*. Bol. Téc. Ed. Especial. ESPE. Sangolquí, Ecuador. 38p. Consultado el 17 de Julio del 2017. Recuperado de <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/3521/1/B-ESPE-000801.pdf>.
- Lee, CN.; Wong, KL.; Liu, JC.; Chen, YJ.; Cheng, JT. & Chan, P. (2001). Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce anti-hypertension. Planta Med.67:796–9.
- Leja, M.; Mareczek, G.; Wyzgolik, G.; Klepacz-Baniak, J. & Czekońska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. Food Chem., 100, 237-240.
- Lemus, R.; Vega, L.; Zura. & K, Ah. (2012). *Stevia rebaudiana Bertoni*, fuente de un edulcorante natural de alta potencia: Revisión exhaustiva de los aspectos bioquímicos, nutricionales y funcionales. Food Chemistry, 132, pp.1121-1132.
- Liu, J.; Jin-wei, L. & Jian, T. (2010). *Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from Stevia rebaudiana Bertoni and identification of extracts*. Food Bioprod. Process. 88(2-3), 215-221. Consultado el 25 de Julio del 2017. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2009.12.005>
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Hdl.handle.net. Consultado 20 Septiembre 2017, Recuperado de <http://hdl.handle.net/10567/133>
- Lustig, D.; Peterson, K. & Gortmaker, S. (2001). *Relation between consumption of sugar sweetened drinks and childhood obesity: A prospective, observational analysis*. The Lancet, 357, 505-508.



- Ma, L.; Geiser, D.; Proctor, R.; Rooney, A.; O'Donnell, K.; Trail, F.; Gardiner, D.; Manners, J. & Kazan, K. (2013). *Fusarium* Pathogenomics. Annual Review of Microbiology 67:1, 399-416. DOI: 10.1146 / annurev-micro-092412-155650
- Ma, L.; Geiser, D.; Proctor, R.; Rooney, A.; O'Donnell, K.; Trail, F. & Kazan, K. (2013). *Fusarium* Pathogenomics. Annual review of microbiology, 67, 399-416.
- Macia, E.; Monesterolo, V. & Toselli, A. (s.f). Evaluación de los procesos de extracción y purificación de los compuestos endulzantes de la hoja de *Stevia rebaudiana*. Facultad Regional Villa María, Universidad Tecnológica Nacional, Grupo de Investigación en Simulación para Ingeniería Química, (GISIQ). Córdoba, Argentina. Recuperado de [http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal\\_frvn/CyTAL\\_2008/Trabajos%20y%20Prologo/versi%C3%B3n%20correlativa%20PDF/TFA017%20Evaluaci%C3%B3n%20del%20proceso%20de%20extracci%C3%B3n%20y%20purificaci%C3%B3n%20-%20Actas.pdf](http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal_frvn/CyTAL_2008/Trabajos%20y%20Prologo/versi%C3%B3n%20correlativa%20PDF/TFA017%20Evaluaci%C3%B3n%20del%20proceso%20de%20extracci%C3%B3n%20y%20purificaci%C3%B3n%20-%20Actas.pdf)
- Malik, V.; Schulze, M. & Hu, F. (2006). Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. Am J Clin Nutr. 84:274–88.
- Manish, B. & Rema, S. (2006) In vitro antimicrobial activity of *Stevia Rebaudiana* Bertoni leaves. Food Biotechnology Laboratory, Post Graduate Department of Home Science, Sardar Patel University, Vallabh Vidyanagar-388 120 Gujarat, INDIA. Recuperado de <http://www.tjpr.freehosting.net>
- Maricruz, O.; Ixtlipaktzin, A.; Marta, L. & Sandra, L. (2015). Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de *stevia rebaudiana* bertoni sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas. Guadalajara. Puebla 72592.
- Mattes, R. & Popkin, B. (2009). Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. Am J Clin Nutr. 89, 1-14.
- Mitscher, L.; Drake, S.; Gollapundi, S. & Okwute, S. (1987). A modern look at folkloric use of anti-infective agents. Journal of Natural Products, 50 pp. 1025-1040.

- Monaim, M.; Elyousr, K. & Morsy, K. (2011). Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). Crop protection, 30(2), 185-191.
- Mousumi, D. (2008). Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 2(2), pp. 045-051. Academic Journals. Recuperado de <http://www.academicjournals.org/JMPR>
- Murray, P.; Rosenthal, K. & Kobayashi, G et al. (2006). Microbiología Médica. Ed. Elsevier, 5ta Ed. Madrid. España.
- Nabors, L. (2012). *Alternative sweeteners*. Boca Raton, FL: CRC Press. Recuperado de <http://www.worldcat.org/oclc/760056415>
- Naeini, A.; Ziglari, T.; Shokri, H. & Khosravi, A. (2010). Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology, 20(3), 174-178.
- Ncube, N.; Afolayan, A. & Okoh, A. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. Journal of Biotechnology, 7(12), 1797-1806. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.5897/ajb07.613>
- Nelson, P. (1981). Life cycle and epidemiology of Hammer. p. 51-80. En M.E. Mace, A.A. Bell and e.H. Beckman (eds.). Fungal wilt diseases of plants. Academic Press. New York.
- Nychas, G. (1995). Natural antimicrobials from plants. In New Methods of Food Preservation; Gould, G. W., Ed.; Blackie Academic and Professional: London, United Kingdom,; pp 58-59.
- O'Keefe, J. & Bell, D. (2007). Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. American J Cardiol 100: 899–904.
- Olszowy, M. & Dawidowicz, AL. (2018) Is it possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds?. Chem. Pap. 72: 393. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0288-3>.
- Ortoneda, M.; Guarro, J.; Madrid, M.; Caracuel, Z.; Roncero, M.; Mayayo, E. & Di Pietro, A. (2004). *Fusarium oxysporum* as a Multihost Model for the Genetic Dissection

- of Fungal Virulence in Plants and Mammals. *Infection and Immunity*, 72(3), 1760–1766. Recuperado de <http://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1760-1766.2004>.
- Parrilla, C.; Vázquez, C.; Saldate, C. & Nava, F. (1993). Brotes de Toxiinfecciones Alimentarias de Origen Microbiano y parasitario. *Salud Pública de México*;35:456-463.
- Pérez, G. (2013). Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175. [tesis para optar el título de Cirujano Dentista]. Universidad Nacional de Trujillo; 70p.
- Pérez, R.; Vargas, R.; Martínez, F.; García, E. & Hernández, B. (2003). Actividad antioxidante de los alcaloides de *Bocconia arborea*. Estudio sobre seis métodos de análisis. *Ars Pharmaceutica*; 44 (1): 5-21.
- Phillipson, J. (1994). Transaction of the royal society of tropical medicine and hygiene Natural Products as drugs; 88, supplement 1: 17-19.
- Pierre, B. (2006). Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *The Journal of nutrition*. Vol 136. p. 2368-2373.
- Puri, M.; Sharma, D.; Barrow, C. & Tiwary, A. (2012). Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry*, 132(3), 1113–1120. Recuperado de <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.063>
- Puri, M.; Sharma, D.; Barrow, C. & Tiwary, A. (2012). *Optimization of novel method for the extraction of steviosides from Stevia rebaudiana leaves*. *Food Chemistry*, 132(3), 1113–1120. Consultado el 12 de Julio del 2017. Recuperado de <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.063>
- Radimer, K.; Bindewald, B.; Hughes, J.; Ervin, B.; Swanson, C. & Picciano, M. (2004). *Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000*. En: *American journal of epidemiology*. Vol. 160, no. 4. p. 339-349. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286019>.
- Raouf, U.; Beuchat, L. & Ammar, M. (1993). Survival and Growth of *Escherichia coli* O157:H7 on Salad Vegetables. *Applied Environmental Microbiology*.;59:1999-2006.

- Raouf, U.; Beuchat, L. & Ammar, M. (1993). Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), 1999–2006.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Protegente, A.; Pannala, AS.; Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, pp. 1231-1237.
- Reis, I.; Santos, S.; Santos, L.; Oliveira, N.; Freire, M.; Pereira, J. & Lima, Á. (2012). Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. *Food Chemistry*, 135, págs. 2453 – 2461
- Reyes, K.; Ramos, D.; Luna, A.; Botello, C.; Paredes, D. & Macedo, J. (2018) Efecto antibacteriano in vitro del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus sanguinis* y *Actinomyces viscosus*, bacterias iniciadoras en la formación de biopelícula dental. *Odontología Sanmarquina*, 21(1), 21-25.
- Reyes, R.; Herrera, M. & Menacho, L. (2014) Estudio de la Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Santa, Ancash-Perú.
- RIRDC. (2002). *Rural Industries Research and Development Corporation*. A new rural industry - Stevia - to replace imported chemical sweeteners. Web Publication No. W02/022. Consultado el 25 de Julio del 2017. Recuperado de <http://www.rirdc.gov.au>; consulta: julio de 2017.
- Robles, Á.; López, O.; Ferrer, M. & Calderón, A. (2016). Methanol elicits the accumulation of bioactive steviol glycosides and phenolics in *Stevia rebaudiana* shoot cultures. Department of Agricultural Science and Technology, Universidad Politécnica de Cartagena, Spain. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.054>.
- Ruiz, J.; Moguel, Y.; Basto, Á. & Segura, M. (2015). Antioxidant capacity of leaf extracts from two *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties adapted to cultivation in Mexico. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán, México. DOI:10.3305/nh.2015.31.3.8043.


- Salyers, A. & Dixie, D. (1994). *Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach*. 1. ed. Washington D.C. American Society for Microbiology.:418.
- Sánchez, G.; Castillo, H. & García, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 77-100.
- Sánchez-García, E.; Castillo-Hernández, S. & García-Palencia, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 77-100.
- Shahidi, F. & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review *Journal of Functional Foods*, 18, págs. 820- 897
- Shariff, Z. (2001). *Modern Herbal Therapy for Common Ailments*. Nature Pharmacy Series (Volume 1), Spectrum Books Limited, Ibadan, Nigeria in Association with Safari Books (Export) Limited, United Kingdom,.pp 9-84.
- Shruti, S.; Archana, M.; Pradeep, M. & Vivek, K. Bajpai. (2012). Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Republic of Korea. Elsevier GmbH. All rights reserved. doi:10.1016/j.etp.2011.02.002.
- Siddique, A.; Rahman, S. & Amzad, M. (2016). Chemical composition of essential oil by different extraction methods and fatty acid analysis of the leaves of *Stevia Rebaudiana Bertoni*. Department of Chemistry, University of Dhaka, Banglades. *Arabian Journal of Chemistry* Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.01.004>
- Singh, S.; Garg, V.; Yadav, D.; Nadeem, B.; Mohd. & Sharma, N. (2012). In-vitro antioxidative and antibacterial activities of various parts of *Stevia rebaudiana* (bertoni). Department of Bioscience and Biotechnolgy, Banasthali University, India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/228613331>

- Singleton, V.; Orthofer, R. & Raventos, R. (1999). Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299 pp. 152-178.
- Smid, E. & Gorris, L. (1999). Natural antimicrobials for food preservation. In *Handbook of Food Preservation*; Rahman, M. S., Ed.; Marcel Dekker: New York,. pp 285-308.
- Soto, H. (2007). “*Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (lippia graveolens hbk var. Berlandieri Schafer)*” *Fitotecnia Mexicana*, vol 30 no. 1 Chapingo, México pp 43 – 49.
- Suk, J.; Boylan, N.; Trehan, K.; Tang, B.; Schneider, C.; Lin, J. & Hanes, J. (2011). La N-acetilcisteína mejora la penetración del esputo de fibrosis quística y la transferencia génica de las vías respiratorias mediante nanopartículas de ADN altamente compactadas. *Terapia molecular* , 19 (11), 1981-1989. Recuperado de <http://doi.org/10.1038/mt.2011.160>
- Sumit, G.; Enketeswara, S. & Sanghamitra, N. (2008). Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens. *International Journal of Integrative Biology*. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/26516923>.
- Tomita, N.; Sato, T.; Arai, H.; Shiraishi, M.; Sato, M.; Takeuchi & Y, Kamio. (1997). Bactericidal activity of a fermented hot-water extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni towards enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other food-borne pathogenic bacteria. *Microbiol Immunol.*; 41(12): 1005–1009. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1997.tb01961.x
- Tadhani, M.; Patel, V. & Rema, S. (2007). *In vitro antioxidant activities of Stevia rebaudiana leaves and callus*. *J. Food Compos.* 20, 323-329. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.08.004>
- Tamayo, V. (2006). *Tecnología para el cultivo de la estevia*. Manual técnico 7. CORPOICA. Centro de Investigación La Selva. Rionegro, Antioquia, Colombia. 116 pp.
- Taroco, R.; Seija, V. & Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de bacteriología y Virología Médica*, (Cim), 663-672.

- Tauxe, R. (1997). Emerging food borne diseases: An evolving public health challenge. *Dairy Food Environ. Sanit.*; 17: 788-795.
- Tomita, T.; Sato, N.; Arai, T.; Shiraishi, H.; Sato, M.; Takeuchi, M. & Kamio, Y. (1997). Actividad bactericida de un extracto de agua caliente fermentado de *Stevia rebaudiana* Bertoni hacia *Escherichia coli* enterohemorrágica O157: H7 y otras bacterias patógenas transmitidas por los alimentos. *Microbiology and Immunology*, 41: 1005-1009. doi: 10.1111 / j.1348-0421.1997.tb01961.x.
- Tomoko, N.; Takashi, A.; Hiromu, T.; Yuka, I.; Hiroko, M.; Munekaju, I.; Totshiyuki, T.; Tetsuro, I.; Fujio, A.; Iriya, I.; Tsutomu, N. & Kazuhito, W. (2002). Antibacterial activity of extracts prepared from tropical and subtropical plants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Health Sci.*, 48: 273–276.
- Torres, G. (2000). ALGUNOS ASPECTOS DE LOS HONGOS DEL GENERO *Fusarium* Y DE LA ESPECIE *Fusarium oxysporum*. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Vol 17: pp 11-22.
- Torres, M.; Álvarez, J. & Artigas, A. (2002). Tratado de cuidados críticos y emergencias. Ediciones Arán SL. Madrid. España.
- Tovar, G. & Cupé, A. (2016). Actividad antimicrobiana de la stevia en comparación con el xilitol, frente a los *Streptococcus mutans* – un estudio in vitro. Universidad Privada Norbert Wiener. Revista OACTIVA UC Cuenca . Vol. 1, No. 2, pp. 51-54,.
- Usha, K.; Singh, B.; Praseetha, P.; Deepa, N.; Agarwal, D.; Agarwal, R. & Nagaraja, A. (2009). Antifungal activity of *Datura stramonium*, *Calotropis gigantea* and *Azadirachta indica* against *Fusarium mangiferae* and floral malformation in mango. *European journal of plant pathology*, 124(4), 637-657.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.; Mazur, M. & Telser, J. (2007). *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. En: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology Vol. 39, no. 1. p.44-84. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905>.
- Villa, M.; Pérez, L.; Morales, M.; Basurto, S.; Soto, P. & Martínez, E. (2015) Situación actual en el control de *Fusarium spp.* y evaluación de la actividad antifúngica de

- extractos vegetales. *Acta Agron.*, Volumen 64, Número 2, p. 194 - 205.  
Recuperado de <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Vincenzo, D. & Ennio, E. (2003). Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Current Drug Targets CNS & Neurological Disorders*; (2): 95-107.
- Willett, Walter. & Mac, Mahon. (1984). *Diet and cancer--an overview (second of two parts)*. En: *The New England Journal of Medicine*. N° 310. p. 697-703.
- Williams, W.; Cuvelier, M. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*. 28, 25–30.
- Zamora, F.; García, P.; Ruiz, M. & Salcedo, E. (2008). Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (*Fabaceae*) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. *Agrociencia*; Feb-Mar 42 (2):185-192.
- Zeng, J.; Cai, W.; Yang, W. & Wei, W. (2013) Antioxidant Abilities, Phenolics and Flavonoids Contents in the Ethanolic Extracts of the Stems and Leaves of Different *Stevia rebaudiana* Bert Lines. *Agronomy College, Sichuan Agricultural University, Chengdu, China. Sugar Tech* 15: 209. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s12355-013-0210-4>
- Zhou, K.; Zhao, F.; Liu, Z.; Zhuang, Y.; Chen, L. & Qiu, F. (2009) Triterpenoids and flavonoids from celery (*Apium graveolens*). *J Nat Prod*; 72(9):1563-7
- Žlabur, J.; Voća, S.; Dobričević, N.; Brnčić, M.; Dujmić, F. & Brnčić, S. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences*. Recuperado de <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/intag.2015.29.issue-2/intag-2015-0017/intag-2015-0017.pdf>.



 <b>Universidad del Tolima</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS</b>  <b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 1 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Los suscritos:

LAURA TATIANA MORALES ORJUELA	con C.C N°	1110545567
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____

Manifiesto (an) la voluntad de:

Autorizar ☒

No Autorizar ☐ Motivo:


La consulta en físico y la virtualización de **mi OBRA**, con el fin de incluirlo en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.

Manifestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado	<input checked="" type="checkbox"/>	Artículo	<input type="checkbox"/>	Proyecto de Investigación	<input type="checkbox"/>
Libro	<input type="checkbox"/>	Parte de libro	<input type="checkbox"/>	Documento de conferencia	<input type="checkbox"/>
Patente	<input type="checkbox"/>	Informe técnico	<input type="checkbox"/>		
Otro: (fotografía, mapa, radiografía, película, video, entre otros)					<input type="checkbox"/>

 <b>Universidad del Tolima</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS</b>  <b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 2 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Producto de la actividad académica/científica/cultural en la Universidad del Tolima, para que con fines académicos e investigativos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad del Tolima. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la Ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Rafael Parga Cortes de la Universidad del Tolima.

De conformidad con lo establecido en la Ley 23 de 1982 en los artículos 30 “**...Derechos Morales. El autor tendrá sobre su obra un derecho perpetuo, inalienable e irrenunciable**” y 37 “**...Es lícita la reproducción por cualquier medio, de una obra literaria o científica, ordenada u obtenida por el interesado en un solo ejemplar para su uso privado y sin fines de lucro**”. El artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “**los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores**” y en su artículo 61 de la Constitución Política de Colombia.

- Identificación del documento:

Título completo: **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO VEGETAL OBTENIDO DE UN CULTIVO COMERCIAL DE *Stevia rebaudiana* UBICADO EN OLAYA (ANTIOQUIA)**

- Trabajo de grado presentado para optar al título de:

**BIÓLOGO**

- Proyecto de Investigación correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

---

- Informe Técnico correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

---

- Artículo publicado en revista:


---

- Capítulo publicado en libro:

---

- Conferencia a la que se presentó:

---


 <b>Universidad del Tolima</b>	<b>PROCEDIMIENTO DE FORMACIÓN DE USUARIOS</b>  <b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL</b>	Página 3 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 03
		Fecha Aprobación: 15 de Febrero de 2017

Quienes a continuación autentican con su firma la autorización para la digitalización e inclusión en el repositorio digital de la Universidad del Tolima, el:

Día: **09** Mes: **JULIO** Año: **2018**

Autores:

Firma

Nombre:	LAURA TATIANA MORALES ORJUELA		C.C.	1110545567
Nombre:	_____	_____	C.C.	_____
Nombre:	_____	_____	C.C.	_____
Nombre:	_____	_____	C.C.	_____

El autor y/o autores certifican que conocen las derivadas jurídicas que se generan en aplicación de los principios del derecho de autor.